

Aus der Klinik für Innere Medizin – Kardiologie  
Geschäftsführender Direktor Prof. Dr. med. B. Maisch  
des Fachbereichs Medizin der Philipps Universität Marburg  
in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum  
Giessen und Marburg GmbH, Standort Marburg

# Identifizierung von Mutationen im Desmin-Gen bei Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie

Inaugural Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin  
dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg vorgelegt von

Michael Klug  
geb. am 01.10.1983  
in Herford

Marburg 2012

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am 22.08.2012

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. M. Rothmund

Referent: Prof. Dr. mult. T. Meyer

1. Koreferent: Prof. Dr. A. Brehm

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	4 - 15
1.1 Pathogenese der Kardiomyopathie	4
1.2 Dilatative Kardiomyopathie	7
1.3 Desmin-Mutationen bei der dilatativen Kardiomyopathie	12
<b>2. Methoden und Material</b>	16 - 23
2.1 Patienten	16
2.2 Primersequenzen	16
2.3 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	17
2.4 Denaturierende Gradientengel-Elektrophorese (DGGE)	18
2.5 Einzelstrang-Konformations-Polymorphismus-Analyse (SSCP)	21
2.6 Berechnung der Pathogenität von Mutationen	22
2.7 Materialliste	23
<b>3. Ergebnisse</b>	24 - 36
3.1 Ergebnisse der Vorversuche	24
3.2 Ergebnisse der Denaturierende Gradientengel-Elektrophorese	26
3.3 Ergebnisse der Einzelstrang-Konformations-Polymorphismus-Analyse	31
<b>4. Diskussion</b>	33 - 51
<b>5. Zusammenfassung</b>	52 - 53
<b>6. Literaturverzeichnis</b>	54 - 65
<b>7. Lebenslauf</b>	66 - 67
<b>8. Verzeichnis der akademischen Lehrer</b>	68
<b>9. Danksagung</b>	69
<b>10. Ehrenwörtliche Erklärung</b>	70

# 1. Einleitung

Im Rahmen des Kompetenznetzes Herzinsuffizienz (KNHI) ist zur Identifizierung von Kardiomyopathie-assoziierten Genmutationen eine genetische Untersuchung durchgeführt worden, um epidemiologische Zusammenhänge von Sequenzveränderungen im Desmin-Gen, namentlich Mutationen und Polymorphismen, mit dem Schweregrad der dilatativen Kardiomyopathie (DCM) aufzudecken. Das Screening beruhte auf der Annahme, dass nach aktueller Studienlage Sequenzveränderungen im Desmin-Gen an 1-2% aller familiären Formen von dilatativen Kardiomyopathien beteiligt sind. Dazu wurden DNA-Proben von DCM-Patienten mittels denaturierender Gradienten-Gel-Elektrophorese (DGGE), Einzelstrang-Konformations-Polymorphismus-Analyse und direkter DNA-Sequenzierung auf das Vorliegen von Mutationen und/oder Polymorphismen im humanen Desmin-Gen analysiert.

## 1.1 Pathogenese der Kardiomyopathie

Kardiomyopathien werden in primäre und sekundäre Kardiomyopathien unterteilt: Eine primäre Kardiomyopathie liegt vor, wenn bei Ausschluss von ursächlichen Grunderkrankungen, wie einer koronaren Herzkrankheit (KHK), arterieller Hypertonie, Vitien oder kongenitalen Herzerkrankungen, eine myokardiale Dysfunktion mit einem strukturell und funktionell abnormalen Myokard besteht. Als eine sekundäre Kardiomyopathie bezeichnet man eine strukturelle Herzerkrankung, die ursächlich auf eine nicht-kardiale Erkrankung, wie arterielle Hypertonie, Vitien, etc., zurückgeführt werden kann und dadurch – sekundär – eine Kardiomyopathie auslöst (Schönberger et al., 2004).

Seitdem die American Heart Association (AHA) 2006 eine neue Klassifikation der Kardiomyopathien veröffentlicht hat, unterscheiden sich die Klassifikationen der AHA und der Europäischen Gesellschaft für Kardiologie (ESC) wesentlich voneinander: Während die AHA die primären Kardiomyopathien in genetische, gemischte und erworbene Kardiomyopathien unterteilt, um so der in den letzten Jahren deutlicher gewordenen genetischen Ursachen Rechnung zu tragen, stellt die ESC nach wie vor in ihrer Klassifikation das klinische Erscheinungsbild in den Vordergrund und unterteilt zweitrangig nach der Ursache des Leidens. Eine Darstellung der Unterschiede in den Klassifikationen ist den Abbildungen 1 und 2 zu entnehmen.

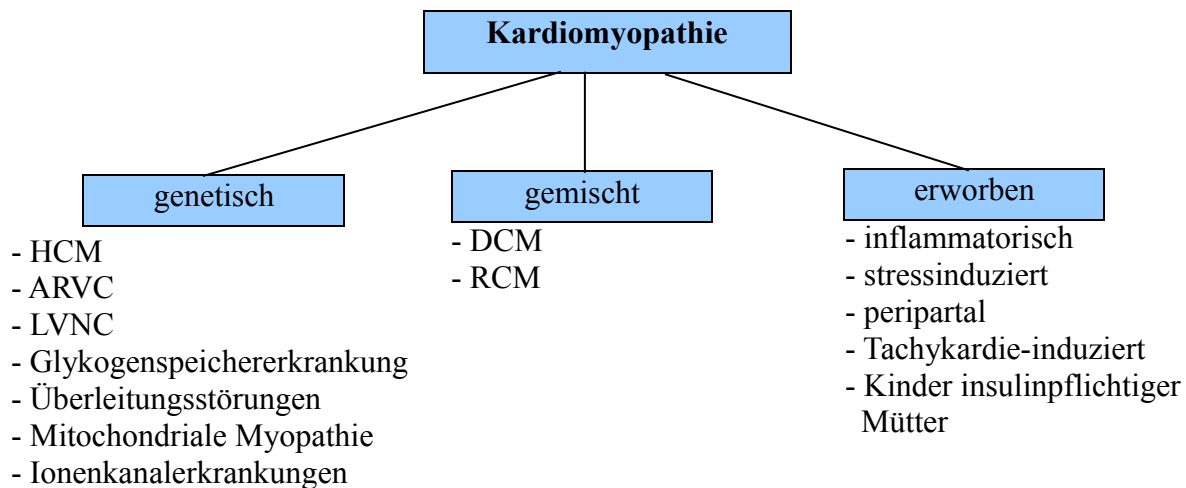


Abb. 1: Klassifikation der Kardiomyopathien nach AHA 2006

HCM: hypertrophe Kardiomyopathie, ARVC: arrhythmogene rechts-ventrikuläre Kardiomyopathie, LVNC: links-ventrikuläre Non-Compaction-Kardiomyopathie, DCM: dilatative Kardiomyopathie, RCM: restriktive Kardiomyopathie.

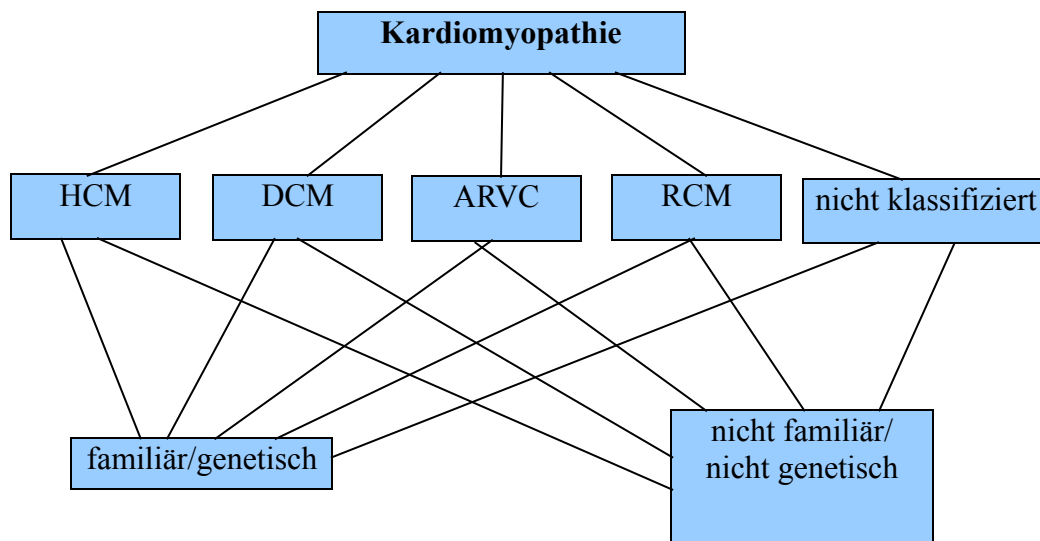


Abb. 2 Klassifikation der Kardiomyopathien nach ESC 2008

HCM: hypertrophe Kardiomyopathie, ARVC: arrhythmogene rechts-ventrikuläre Kardiomyopathie, LVNC: links-ventrikuläre Non-Compaction-Kardiomyopathie, DCM: dilatative Kardiomyopathie, RCM: restriktive Kardiomyopathie.

Im Folgenden werden ausschließlich die primären Kardiomyopathien sowie die europäische Klassifikation abgehandelt. Im Wesentlichen werden folgende Formen von Kardiomyopathien unterschieden: 1.) Die hypertrophe Kardiomyopathie (HCM) ist eine myokardiale Hypertrophie ohne hämodynamisch erklärbare Ursache und ohne

systemische Erkrankungen wie beispielsweise die Amyloidose. Bei der HCM handelt es sich um eine Herzerkrankung, deren genetische Ursache weitgehend belegt ist: Bislang sind mehr als 14 krankheitsassoziierte Gene bekannt, welche weitgehend Proteine kodieren, die am Aufbau des Sarkomers beteiligt sind (Elliott et al., 2008). 2.) Die dilatative Kardiomyopathie (DCM) ist gekennzeichnet durch linksventrikuläre Dilatation und Dysfunktion bei Abwesenheit von hämodynamischen Korrelaten, wie Hypertonie oder Vitien beziehungsweise koronarer Herzerkrankung. Eine Beteiligung des rechtsventrikulären Systems ist möglich, für die Stellung der Diagnose allerdings nicht notwendig. Auch bei der dilatativen Kardiomyopathie handelt es sich zum Teil um eine genetische Erkrankung. Im Gegensatz zur hypertrophen Kardiomyopathie spielt allerdings die infektiöse Genese über virale und/oder bakterielle Myokarditiden eine bedeutende Rolle. Ein weiterer Teil der Erkrankungen ist idiopathischer Natur, so dass die Ursachen der DCM breiter gefächert und zum Teil nicht hinreichend aufgeklärt sind (Elliott et al., 2008). 3.) Die restriktive Kardiomyopathie (RCM) ist charakterisiert durch eine Versteifung vor allem des linksventrikulären Myokards, was zu einem hohen Druckanstieg im Ventrikel während der Systole mit nur geringer Auswurfsfraktion führt (Elliott et al., 2008). 4.) Bei der arrhythmogenen rechtsventrikuläre Kardiomyopathie (ARVC) finden sich eine histologisch nachweisbare zunehmende Durchsetzung des rechten Ventrikels mit Adipozyten und Fibrozyten; unter Einbeziehung des linken Ventrikels kann das Bild einer DCM entstehen (Elliott et al., 2008). 5.) Zuletzt seien noch die unklassifizierten Kardiomyopathien, wie beispielsweise die linksventrikuläre Non-Compaction (LVNC) und Takotsubo-Kardiomyopathie, erwähnt (Elliott et al., 2008). Gemeinsam ist allen Kardiomyopathien mit Ausnahme der Takotsubo-Kardiomyopathie, deren Krankheitsverlauf als „restitutio ad integrum“ verläuft, dass die Lebensqualität und Lebenserwartung der Patienten zum Teil massiv eingeschränkt sind.

Die primären Kardiomyopathien werden weiterhin in ihrer Genese nach familiär und nicht-familiär unterteilt. Nicht-familiäre Kardiomyopathien sind dabei klinisch definiert als vereinzelt auftretende Kardiomyopathie bei unauffälliger Familienanamnese. Bei der familiären Kardiomyopathie sind entsprechend genetisch verwandte Individuen ebenfalls betroffen. Ebenso sollten Familien mit einem gehäuftem Auftreten von plötzlichem Herztod, Erkrankungen des Reizleitungssystems sowie skelettalen Myopathien betrachtet werden, da eine genetische Ursache wahrscheinlich ist (Elliot et al., 2008).

## 1.2 Dilatative Kardiomyopathie

Bei der dilatativen Kardiomyopathie (DCM) handelt es sich um die häufigste primäre Kardiomyopathie mit einer Inzidenz von ca. 6/100.000/J und einer Prävalenz von ca. 36/100.000. Das Geschlechterverhältnis beträgt dabei 2:1 zu Ungunsten der Männer. Der Altersgipfel liegt bei der familiären dilatativen Kardiomyopathie zwischen der 2. und 3. Lebensdekade, bei der nicht-familiären DCM zwischen der 4. und 5. Dekade. Eine Hauptursache für die dilatative Kardiomyopathie ist die inflammatorische Kardiomyopathie (DCMi), die über eine Virusinfektion durch Enteroviren, Adenoviren u.a. ausgelöst wird und die etwa 60% aller Fälle betrifft. Unter Ausbildung einer postviralen Autoimmunität persistiert und verselbständigt sich die Erkrankung. Einen weiteren wesentlichen Anteil machen die genetischen Formen der DCM aus. Eine familiäre Häufung ist je nach Literatur in 30-40% der Fälle zu beobachten (Maisch et al., 2002; Maisch, 2007). Des weiteren wird eine Triggerung durch Alkoholkonsum und/oder Schwangerschaft diskutiert. Bis zu 40% der Erkrankungen sind idiopathischer Natur.

Klinisch ist die dilatative Kardiomyopathie durch eine Vergrößerung der Herzhöhle mit Ausdünnung der Wandstärke, vornehmlich des linken Ventrikels, charakterisiert, die zu einer progredienten Abnahme der kardialen Kontraktilität und damit zu einer vorwiegend systolischen Pumpfunktionsstörung durch Einschränkungen der ventrikulären Ejektionsfraktion führt (Maisch et al., 2002; Luk et al., 2009). Die Erkrankung verhält sich dabei lange symptomlos und äußert sich klinisch vor allem durch eine progressive Linksherzinsuffizienz mit Zeichen der Belastungsdyspnoe und später durch eine Globalherzinsuffizienz. Erste Zeichen sind Atemnot bei Belastung, Palpitationen sowie ein unbestimmtes Druckgefühl in der Brust, periphere Ödeme vornehmlich der unteren Extremität oder gar epigastrische Beschwerden. Beim Vollbild der Herzinsuffizienz kann der Herzspitzenstoß verstärkt tastbar sein, ein 3. oder 4. Herzton kann auftreten. Des weiteren können Mitral- und/oder Trikuspidalklappeninsuffizienzen auftreten mit entsprechend auskultierbaren Strömungsgeräuschen sowie gestauten Halsvenen. Ferner kommen Beinödeme und eine Stauungsleber sowie Orthopnoe mit Ruhedyspnoe gehäuft im Endstadium vor. Rhythmusstörungen, besonders ventrikulärer Art, treten ebenso wie thrombembolische Komplikationen häufig auf, so dass nicht selten Fälle von plötzlichem Herztod und kardialen Embolien beobachtet werden. Die Lebenserwartung ist reduziert, so beträgt die 5-Jahresüberlebensrate nach klinischer Diagnose ca. 50% und die 10-Jahresüberlebensrate je nach Grad der Herzinsuffizienz und der Ejektionsfraktion zwischen 10

und 20%. Insbesondere bei Kardiomyopathien, ausgelöst durch Mutation im Desmin-Gen, ist zu bedenken, dass das klinische Bild auch dem einer Desminopathie entsprechen kann, so dass die kardiale Komponente nicht im Vordergrund stehen muss. Neben den oben beschriebenen kardialen Symptomen sind langsam progressive Myopathien, Dyspnoe, Dysphagie und Dysphonie möglich. Insbesondere bei der physikalischen Untersuchung der Patienten können Schwächen in proximaler als auch distaler Muskulatur auffallen. Schwerpunktmäßig sind Muskeln des Körperstammes, Halsflexoren und Gesichtsmuskulatur betroffen. Sehnenreflexe können vermindert oder normal sein, eine restriktive Atemstörung kann als Begleiterscheinung der myopathischen Atemmuskulatur auftreten (Goldfarb et al., 2008).

Ähnlich der Diagnostik bei anderen Ursachen der Herzinsuffizienz stehen auch bei der Diagnose der DCM Basismaßnahmen im Vordergrund. Neben der Anamnese haben hier insbesondere Elektrokardiographie (EKG) und Echokardiographie einen hohen Stellenwert. Bereits durch ein abgeleitetes EKG lassen sich prognoserelevante Parameter, wie das Vorliegen von tachykarden Herzrhythmusstörungen, AV-Blockierungen oder Schenkelblockaden, nachweisen. Durch Echokardiographie lassen sich eine Dilatation der Ventrikel und systolische bzw. diastolische Funktionseinschränkungen zuverlässig nachweisen. Um letztendlich die Diagnose einer primären DCM stellen zu können, ist allerdings der Ausschluss einer koronaren Herzerkrankung durch eine Herzkatheter-Untersuchung erforderlich (Frey und Katus, 2008). Differentialdiagnosen wie beispielsweise eine juvenile Hämochromatose müssen ebenfalls ausgeschlossen werden (Burri et al., 2008). Die Abgrenzung zwischen inflammatorischer und hereditärer DCM erweist sich zudem als therapeutisch bedeutsam. Es empfiehlt sich daher die Durchführung einer Biopsie des Herzmuskels sowie die Erhebung serologischer Untersuchungen (Maisch et al., 2002).

Mestroni und Koautoren definierten 1999 für die Diagnose der DCM zwei Hauptkriterien, nämlich 1.) eine linksventrikuläre Ejektionsfraktion von  $<45\%$  sowie ein Fractional-Shortening von  $<25\%$  und 2.) ein linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser von  $>117\%$ . Ferner werden 6 Nebenkriterien definiert: 1.) supraventrikuläre oder ventrikuläre Arrhythmien (Lown IVb) vor dem 50. Lebensjahr, 2.) ein linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser  $>112\%$ , 3.) eine linksventrikuläre Ejektionsfraktion von  $<50\%$  oder ein Fractional-Shortening von  $<28\%$ , 4.) das Vorliegen eines AV-Blockes II.° oder III.°, ein Linksschenkelblock oder eine Sinusknotendysfunktion, 5.) ein ungeklärter plötzlicher Herztod vor dem 50. Lebensjahr und 6.) eine segmentale Wandbewegungsstörung (Mestroni et al., 1999a). Die Diagnose einer fDCM kann bei Vorliegen von einem



Hauptkriterium oder einer linksventrikulären Dilatation und einem Nebenkriterium sowie bei Vorhandensein von drei Nebenkriterien gestellt werden (Mestroni et al., 1999a). Insbesondere bei Vorliegen von diagnostischen Kriterien sollte eine genaue Familienanamnese erhoben und eine genetische Beratung und Untersuchung des Patienten erfolgen sowie weitere kardiologische Untersuchungsverfahren den Verwandten des Patienten empfohlen werden. Aufgrund der Persistenz der Erkrankung im mittleren Lebensalter bietet sich auch bei einem negativen Screening-Befund gerade bei jungen Probanden eine auf lange Sicht durchgeführte Follow-up-Kontrolle an.

Hauptkriterien	Nebenkriterien
1. LVEF <45% oder FS <25%	1. Supraventrikuläre Arrhythmien (>LOWN IVb) vpr dem 50. Lebensjahr
2. LVEDD >117%	2. LVEDD >112%
	3. LVEF <50% oder FS<28%
	4. AV-Block II, III, LSB, Sinusknotendysfunktion
	5. Unerklärter plötzlicher Herztod vor dem 50. Lebensjahr
	6. Segmentale Wandbewegungs- störungen

Abb. 3: Zusammenfassung der diagnostischen Kriterien für das Vorliegen einer familiären DCM bei Verwandten ersten Grades nach Mestroni und Koautoren, 1999.

LVEDD: linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser, LVEF: linksventrikuläre Ejektionsfraktion, LSB: Linksschenkelblock, AV: atrioventrikulär, FS: Fractional-Shortening

Gerade bei familiären dilatativen Kardiomyopathien kommt es häufig auch zu extrakardialen Manifestationen, weil gerade Mutationen in den Proteinen des Dystrophin-Komplexes oder von Desmin pathologische Veränderungen der Skelettmuskulatur auslösen. Um eine Beteiligung der Skelettmuskulatur ausschließen zu können, sollte hier auch immer die Serum-Kreatinkinase in der Basislabordiagnostik einbezogen werden (Goldfarb et al., 2008).

Therapeutisch bieten sich bei der Diagnose einer dilatativen Kardiomyopathie zuerst Allgemeinmaßnahmen wie die Abstinenz von kardiotoxischen Substanzen sowie körperliche Schonung und diätetische Maßnahmen, etwa die Restriktion der Flüssigkeits- und Kochsalzzufuhr, an. Bei gesicherter Virusinfektion als Ursache der DCM sollte der Versuch einer Viruselimination zum Beispiel mit Interferon, bei eingetretener Autoimmunogenese hingegen der Einsatz von Immunsuppressiva erwogen werden. In der medikamentösen Langzeittherapie stehen die Behandlung der Herzinsuffizienz und der

häufig auftretenden Rhythmusstörungen an erster Stelle. Hier bietet sich der Einsatz von ACE (Angiotensin-Converting-Enzyme)-Hemmern oder AT2 (Angiotensin-2)-Blockern, Beta-Blockern, Diuretika zur Behandlung der Herzinsuffizienz sowie Antikoagulantien und eventuell Antiarrhythmika zur Behandlung von Rhythmusstörungen an, wobei die Indikation für den Einsatz der Antiarrhythmika aufgrund ihrer proarrhythmogenen Wirkung besonders streng gestellt werden sollte. Mit steigendem Risiko durch plötzlichen Herztod infolge von Herzrhythmusstörungen (>LOWN IIIb, EF von <35%) sollte eine ICD-Implantation für den Patienten individuell erwogen werden. Für Patienten mit unter Therapie progressiver, lebensbedrohlicher Kardiomyopathie verbleibt als Ultima ratio die Herztransplantation (Schönberger et al., 2004).

Um eine möglichst gute Mitarbeit (Compliance) der Patienten bei der Therapie zu erreichen, sollte die Patientenschulung nicht vernachlässigt werden. Eine Schulung bezüglich der Symptome, Risikofaktoren, verschiedener Behandlungsmethoden und deren Nebenwirkungen, Rehabilitation sowie diätetischer Maßnahmen, erweist sich zur Beeinflussung des Krankheitsverlaufes als sinnvoll, um die Schwere der Symptome und den Progress der Erkrankung zu reduzieren sowie die Lebensqualität zu erhöhen (Luk et al., 2009).

Insbesondere bei Vorliegen einer Desminopathie sollte auch die Behandlung anderer teils lebenslimitierender Erkrankungen, insbesondere der Atemmuskulatur, erfolgen. Hier bieten sich vor allem intermittierend eingesetzte Verfahren der CPAP- (Continuous Positive Airway Pressure) oder BIPAP-Beatmung (Biphasic Positive Airway Pressure), initial in der Nacht, mit zunehmendem Progress auch während des Tages, an. Als Indikator für eine Respiratortherapie bieten sich der CO<sub>2</sub>-Partialdruck des Blutes sowie die klinische Diagnose der Dyspnoe an. Insbesondere sollte bei diesen speziellen Krankheitsbildern auch die erhöhte Anfälligkeit der Patienten für Infektionserkrankungen des Thoraxbereichs beachtet werden (Goldfarb et al., 2008). Gen- beziehungsweise Stammzelltherapien sind aktuell noch Gegenstand der Forschung (Goldfarb et al., 2008).

Ebenso wie bei der hypertrophen, obstruktiven Kardiomyopathie (HOCM), bei der die überwiegende Zahl der Fälle eine genetische Ursache für die Erkrankung aufweist, wird nach derzeitigem Stand der Wissenschaft angenommen, dass bei der dilatativen Kardiomyopathie ebenfalls in vielen Fällen ein genetischer Hintergrund besteht. Neben der infektiösen und der idiopathischen DCM macht die familiäre DCM einen bedeutenden Teil von ca. 30 – 40% aus (Elliott et al., 2008; Maisch et al., 2002; Frey et al., 2008). Die Ursache für familiäre Kardiomyopathien ist dabei in verschiedenen Genmutationen zu

suchen. Insbesondere scheinen bei der DCM solche Gene betroffen zu sein, die für Proteine in Wirkungsbeziehung zur Z-Scheibe beziehungsweise als Bestandteile des sarkomeren Apparates kodieren. Die Z-Scheibe dient verschiedenen Proteinen, darunter auch dem Desmin, als Verankerungsstruktur zytoskelettaler Proteine und ermöglicht so die gerichtete Kontraktion der Muskelzellen, was ihre besondere Bedeutung in der Kraftübertragung der Muskulatur deutlich zeigt (Frey et al., 2008).

Häufige Ursachen für eine hereditäre, dilatative Kardiomyopathie sind dabei Mutationen in verschiedenen Genen. Lamin-A/C-Mutationen etwa sind häufig assoziiert mit Erkrankungen des Erregungsleitungssystems, Desmin- und Dystrophin-Mutationen hingegen mit Erkrankungen der Skelettmuskulatur, Mutationen im Desmoplakin- und Plakoglobin-Gen mit wolligen Haaren sowie ARVC und Keratodermatosen, Mutationen im  $\delta$ -Sarcoglycan-Gen mit dem Verlust von Skelettmuskulatur und muskulärer Dystrophie sowie Tafazzin-Mutationen mit Neutropenien und geringer Körpergröße (Luk et al., 2009).

Die Prävalenz von Desminmutationen, die eine isolierte dilatative Kardiomyopathie ohne Beteiligung der Skelettmuskulatur auslösen, ist dabei nicht bekannt (Taylor et al., 2007). Als besonders negativ für die Prognose erweisen sich zudem die rezessiv vererbten Kardiomyopathien, die bereits in früher Kindheit manifest werden (Goldfarb et al., 2008).

So ergibt sich klinisch ein buntes Bild vor allem bezüglich der Nebensymptome einer DCM. Aufgrund klinischer Beobachtung ist allerdings nur in sehr seltenen Fällen bereits vor der molekulargenetischen Bestimmung der Ursache, die Stellung einer korrekten Verdachtsdiagnose bezüglich des betroffenen Gens möglich.

Nach aktueller Studienlage ergibt sich für Desminmutationen folgendes Bild: Während Mutationen der DNA im Segment 2B sich in erster Linie durch Myopathien der Skelettmuskulatur äußern, lösen Mutationen im Segment 1B und der Schwanzdomäne eher eine Kardiomyopathie aus. Als Nebensymptome zur Kardiomyopathie können zudem des weiteren Myopathien der glatten Muskulatur, Neuropathien, respiratorische Dysfunktionen, Lähmungen der Gesichtsmuskulatur und/oder Katarakte auftreten (Goldfarb et al., 2008).

### 1.3 Desmin-Mutationen bei der dilatativen Kardiomyopathie

Desmin ist ein muskelspezifisches, zytoskelettales Intermediärfilamentprotein mit einem Molekulargewicht von 53 kDa, dessen Genlokus auf Chromosom 2q35 durch eine einzelne Genkopie neun Exons mit 8,4 kb umfasst und ein Transkript für 476 Aminosäuren kodiert (Viegas-Péquignot et al., 1984; Li et al., 1989). Es zählt zu der Gruppe der Intermediärfilamente, die von ihrer Größe her zwischen den Mikrofilamenten und den Mikrotubuli eingeordnet werden können. Ihre Hauptaufgabe liegt in der Stabilisierung des Zytoskeletts und damit der mechanischen Stabilisierung der Zelle im Gewebeverband. Neben dem Desmin sind beim Menschen derzeit noch 64 weitere Intermediärfilamentproteine bekannt (Goldfarb et al., 2008).

Desmin hat den klassischen Aufbau eines Intermediärfilamentes mit einer zentralen  $\alpha$ -Helix-Domäne, einer nicht  $\alpha$ -helikalen, aminoterminalen (Head) und einer carboxyterminalen (Tail) Domäne (Weber und Geissler, 1985). Die  $\alpha$ -Helix ist dabei an mehreren Stellen durch nicht-helikale Bereiche durchbrochen, so dass die  $\alpha$ -Helix-Struktur in die Domänen 1A, 1B, 2A und 2B unterteilt werden kann. Von besonderem Interesse ist hierbei die 2B-Domäne in der Nähe des C-Terminus: Annähernd 50% aller bisher bekannten Desminmutationen sind in dieser Domäne lokalisiert (Goldfarb et al., 2008).

Die verschiedenen Intermediärfilamentproteine unterscheiden sich dabei weniger in ihren  $\alpha$ -helikalen Domänen, welche große Ähnlichkeiten besitzen, als vielmehr durch ihre Carboxy- und Aminodomänen, welche die charakteristische Funktion des Filamentmoleküls bestimmen. Im Falle des Desmin liegt die Aufgabe in der Vernetzung des Sarkomers über eine Bindung an die Z-Scheiben mit der Zellmembran. Erst so ist eine gerichtete Kontraktion der Muskelfasern einer Muskelzelle effektiv möglich (Hermann et al., 1996; Rogers et al., 1995; Bär et al., 2004; Bär et al., 2007). Des weiteren stabilisiert Desmin die zelluläre Integrität, ermöglicht die Reizüberleitung von Zelle zu Zelle und ist maßgeblich an der Differenzierung und Entwicklung der Muskulatur beteiligt (Fuchs und Weber, 1994; Bär et al., 2007).

Im Folgenden wird zwischen einer isolierten dilatativen Kardiomyopathie und einer Desminopathie, bei welcher eine Beteiligung von Skelett- und Herzmuskulatur in Kombination oder einer reinen Erkrankung der Skelettmuskulatur vorliegt, unterschieden. Eine Desminopathie wird durch Mutationen im Gen des Desmin selbst oder in Genen für Proteine, die direkt mit Desmin interagieren, wie  $\alpha\beta$ -Crystallin, ein Chaperon, das Proteine stabilisiert und ihre irreversible Aggregation verhindert, ausgelöst (Goldfarb et al., 2008).

Mutationen führen hier zu einer Desintegration der Z-Scheibe und der Myofibrillen sowie zur Akkumulation von ektopen Proteinen. Die Muskelfasern unterliegen größeren Kaliberschwankungen und gelegentlich kommt es zu Fragmentationen der Myofibrillen, so dass die Fasern permanent zur Regeneration gezwungen sind. Durch diesen permanenten Umbauprozess wird die Herzmuskulatur sukzessive, meist über viele Jahre, geschwächt, bis es zur Ausprägung von klinischen Beschwerden kommt. Hauptsymptom stellt in der Mehrzahl der Fälle eine mehr oder weniger stark ausgeprägte, langsam progressive Myopathie der Skelett- und vor allem Herzmuskulatur dar, die sich in der zweiten und dritten Lebensdekade manifestiert (Bär et al., 2004; Bär et al., 2007). Problematisch an der Diagnosestellung ist hier, dass gerade eine Mutation in der Schwanzdomäne des Desmin zu verschiedenen klinischen Manifestationen führen kann. Zudem scheint das proteolytische System der Myozyten einen nicht unerheblichen Einfluss auf den Verlauf der Erkrankung zu haben (Bär et al., 2007).

Aktuell sind über 40 Mutationen im Desmin-Gen bekannt, die eine Desminopathie auslösen können: 5 Mutationen in der aminoterminalen Kopfdomäne, 5 im 1B-Segment, 22 im 2B-Segment und 10 in der carboxyterminalen Schwanzdomäne. Hinzu kommen in der Domäne 1A bislang 2 Mutationen (E108K und N116S) (Bowles et al., 2002; Taylor et al., 2007; Klauke et al., 2010), während in der 2A-Domäne bislang keine Mutation beschrieben wurden. Mutationen im Gen des Desmin werden für etwa 1-2% aller familiären dilatativen Kardiomyopathien verantwortlich gemacht (Taylor et al., 2007). Abbildung 4 gibt eine Übersicht über die bekannten pathogenen Desmin-Mutationen.

Die Mutationen im Desmin-Gen sind verantwortlich für einen Mangel an funktionsfähigem Desmin und einer damit einhergehenden Akkumulation von pathologisch wirkenden Desmin-Mutanten in den Zellen. Insbesondere die Akkumulation von Desmin-Mutanten kann hierbei zur Zerstörung der Muskelfasern führen (Nakano et al., 1996; Wang et al., 2001a). Der pathologische Prozess in den Muskelfasern beginnt dabei an den Z-Scheiben. Durch die Desintegration der Z-Scheiben wird der Prozess der mechanischen Kraftübertragung zwischen den Sarkomeren gestört (Goldfarb et al., 2008). Die Pathogenität der verschiedenen Desminmutationen variiert dabei sehr stark. Während einige Mutationen die Filamentbildung nicht verhindern (z.B. p.A213V), stören einige Mutationen den longitudinalen Ausrichtungsprozess (z.B. p.L385P), wieder andere Mutationen scheinen die Bindungskräfte zwischen den Molekülen zu erhöhen, was zu einer Aggregation der Filamente führt (z.B. p.A337P) und wiederum andere Mutationen zeigen eine rapide Desintegration von eingebauten Filament-Präkursoren (z.B. p.L345P).

(Goldfarb et al., 2008). Einige pathogenetisch relevante Desminmutanten sind in der Lage, bestehende Intermediärfilamentstrukturen zu zerstören. Allerdings sind gerade Mutationen der Schwanzregion des Desmin nicht in der Lage, die normale Organisation des prä-existenten Zytoskeletts zu verändern. Nichtsdestotrotz könnten einige dieser Mutationen negative Effekte auf diverse Funktionen anderer zellulärer Proteine ausüben, welche die Zellfunktion insgesamt einschränken könnten (Goldfarb et al., 2008). Desmin-Knock-out-Mäuse entwickeln sich zunächst offensichtlich normal, obwohl die fehlende Expression von Desmin die räumliche Orientierung der Zellkompartimente verhindert. Während pränatal schon abnormale Sarkomere, geschwollene Mitochondrien oder auch ungewöhnliche Aufteilungen von Myosin in diversen Zellen nachweisbar sind, kommt es post-natal vor allem in stark beanspruchten Muskelgeweben, wie dem Diaphragma oder der Zunge, zum irregulären Aufbau von Muskelfasern. Die Mitochondrien von Skelett- und Herzmuskelzellen sind vergrößert, von größerer Anzahl und nicht korrekt innerhalb der Zellen positioniert. Schließlich kommt es zur Degeneration der Mitochondrien mit negativen Auswirkungen auf den Zellstoffwechsel (Milner et al., 1996). Insbesondere die Herzmuskulatur erweist sich bei den Knock-out-Mäusen als anfällig. Schon bald nach der Geburt kommt es zu Kardiomyopathien durch die Lyse einzelner Kardiomyozyten und zur Invasion von Lymphozyten in das Myokard sowie zu Kalzifizierungen, Fibrose und zur Ausbildung von Nekrosen. Ältere Individuen zeigen das Vollbild einer Muskeldystrophie (Thornell et al., 1997). Desmin hat somit eine essentielle Rolle bei dem Erhalt der strukturellen Integrität der Muskulatur, und das sowohl bei der Skelett- wie der Herzmuskulatur (Paulin et al., 2004a; Paulin et al., 2004b).

## Schematischer Aufbau Desmin und bekannte Mutationen

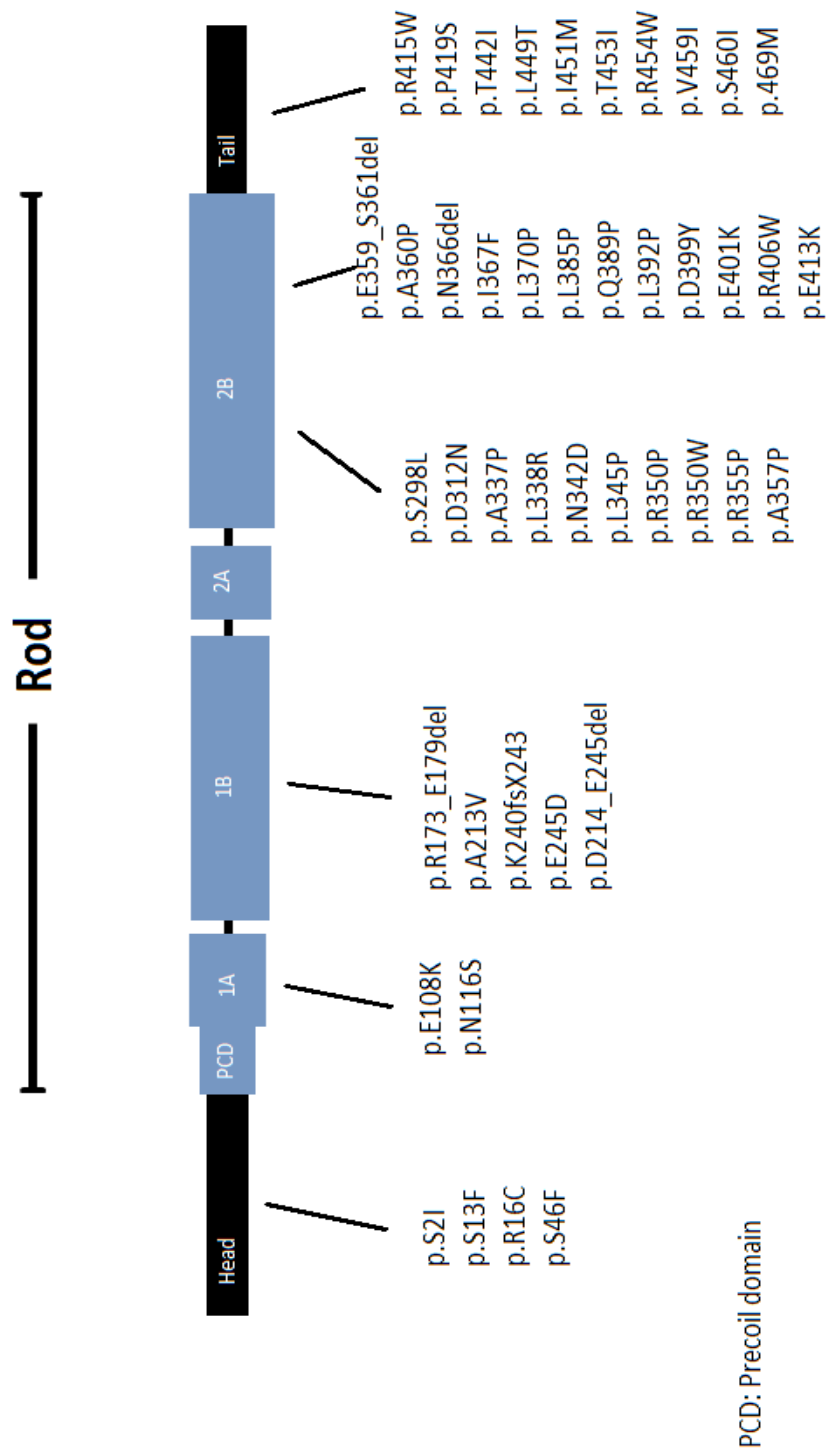


Abb. 4: Organisation der Proteindomänen von Desmin mit Angaben der Lokalisation bekannter Mutationen (nach Goldfarb et al., 2008).

## **2. Methoden und Material**

### **2.1 Patienten**

Die untersuchten Proben umfassten die DNA-Isolate von 235 Patienten mit klinisch diagnostizierter DCM mit und ohne Virusnachweis beziehungsweise histologisch gesicherter lymphozytärer Infiltration, die am Universitätsklinikum Marburg und der Charité Berlin gewonnen wurden. Das Probenkontingent entstammte dem „Kompetenznetz Herzinsuffizienz“ (KNHI) und der Eurogene-Datenbank. Bei dem KNHI handelt es sich um eine nationale Arbeitsgemeinschaft, die dem Austausch verschiedener Arbeitsgruppen zum Thema Herzinsuffizienz dient und die das Ziel verfolgt, die Forschung zu Ursachen und Behandlung der Herzinsuffizienz effizienter und effektiver zu gestalten sowie die Qualität in der Patientenversorgung zu verbessern. Die Eurogene-Datenbank der „European Genetics Foundation“ verfolgt einen ähnlichen Ansatz, beschränkt sich in der Auswahl ihrer genetischen Proben aber nicht auf eine Erkrankung und ist vornehmlich im europäischen Raum tätig.

Die genaue Ursache der DCM bei den in der Studie eingeschlossenen Patienten war nicht in allen Fällen bekannt; bei einigen Patienten galt eine familiäre DCM als gesichert. Bei Studieneinschluss und im Verlauf wurden daher routinemäßig mehrere apparative Untersuchungen durchgeführt, wie echokardiographische Messungen unter Einsatz der Doppler-Sonographie, repetitive elektrokardiographische Bestimmungen, angiographische Darstellungen der Herzkranzgefäße und die bioptische Entnahme von Myokardproben neben serologischen Untersuchung auf Viren und Bakterien. Überdies wurden epidemiologische Daten in anonymisierter Form, wie Alter, Größe und Geschlecht, erfasst. Wurde eine Mutation nachgewiesen, erfolgte die Berechnung der Pathogenität mittels Polyphen 2.0, eine erneute Blutentnahme beim Indexpatienten und wenn möglich, auch bei seinen Familienangehörigen. Im Anschluss an die Familienanamnese wurde ein Stammbaum erstellt.

### **2.2 Primersequenzen**

Die Primersequenzen wurden mithilfe des Programms „Primer 3“ und „WinMelt“ von BioRad erstellt. Anhand der Schmelzkurven wurden an jeweils einen der beiden Primer ein GC-Clamp angehängt, um eine nur partielle Denaturierung des erhaltenen PCR-



Amplifikats unter den Bedingungen des Gellaufs zu erreichen und eine vollständige Denaturierung im Gel zu verhindern. Die Synthese aller in dieser Studie verwendeten Primer erfolgte durch die Firma Invitrogen, Darmstadt. Die Bezeichnungen und Sequenzen der in dieser Studie eingesetzten Primer sind in Abbildung 5. aufgelistet.

Exon	Primersequenz 5'-3'
Des 1_1F	CGC GCT CGC CCG CCA GCC TCG CCC GC
Des 1_1R	CCC GCC GCC CGC CGC TCG CCC GCC GCG CCC CTG CCC GCC GCC CCC GCC CGC AGC TCC ACC TTC TCG TTG
Des 1_2F	CCC GCC GCC CGC CGC TCG CCC GCC GCG CCC CTG CCC GCC GCC CCC GCC CGG CGC AGG CGA GCT GCT GG
Des 1_2R	GCG CGC GCC AGG CCT AGC CTC CTG TGC
Des 2-3F	CCC GCC GCC CGC CGC CAG TCG TTT CCA CTG CC
Des 2-3R	CCC GCC GCC CGC CGC TCG CCC GCC GCG CCC CTG CCC GCC GCC CCC GCC CGA CTT TCC GGC TGC TTT CC
Des 4-5F	CCC GCC GCC CGC CGC TCG CCC GCC GCG CCC CTG CCC GCC GCC CCC GCC CGC CCG CCG CCC GCC GGA GGC TCT GGC TGG GAA TAG
Des 4-5R	CCC GCC GCC CGC CGA GGG TGT GAA CTG CAG ACA G
Des 6 F	CCC GCC GCC CGC CGC TCG CCC GCC GCG CCC CTG CCC GCC GCC CCC GCC CGT TTG GGC TGC TAG TGT CCT C
Des 6R	CCC GCC GCC CGC CGG ACA GAA ATG GAC CAC CCA G
Des 7F	CCC GCC GCC CGC CGC TCG CCC GCC GCG CCG CTT TCT TTA AAT CCT GGG ATT ACA GCT GGG C
Des 7R	CGG CCA TGC TGG ACT CCT GGC
Des 8-9F	CCC GCC GCC CGC CGC TCG CCC GCC GCG CCC CTG CCC GCC GCC CCC GCC CGC CCG CCG CCC GCC GCA GCC CCT GGT ATA GCC C

Abb. 5: Primer-Sequenzen einschließlich der Bezeichnung der in dieser Studie eingesetzten Primer.

## 2.3 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die kodierenden Abschnitte des Desmin-Gens wurden mit Hilfe von PCR-Technologie amplifiziert. In einem ersten Schritt wurden die PCR-Bedingungen (Ansatz und Temperatur) optimiert. Um den Ansatz zu ermitteln, der das jeweils optimale PCR-Ergebnis lieferte, wurden Versuchsreihen mit unterschiedlichen Magnesiumkonzentrationen sowie mit und ohne Zusatz von Dimethyl-Sulfoxid (DMSO) erstellt. Ähnlich wurde bei der Erstellung des PCR-Programms verfahren. Die Proben mit unterschiedlichem Ansatz wurden verschiedenen PCR-Programmen unterzogen, die sich in der Wahl der Annealing-Temperatur und der Anzahl der Zyklen unterschieden. Die Annealing-Temperatur wurde hierfür ausgehend von 65°C in 1°C-Schritten bis auf 55°C reduziert, die Anzahl der Zyklen variierte zwischen 30 und 40. Die verwendeten Programme können Abbildung 6 entnommen werden.

	Temperatur in °C	Zeitdauer in Minuten
Initiale Denaturierung	95	10,5
Zyklus x35		
- Denaturierung	95	1,0
- Annealing	60 - 63	1,0
- Elongation	72	1,0
Abschließende Elongation	72	7,0

Abb. 6: Zeitlicher Ablauf und verwendete Temperatureinstellungen für die PCR.

Die Amplifikate wurden mittels Gelelektrophorese auf einem ethidiumbromidhaltigen, 1,5%-igem Agarose-Gel überprüft. Der Ansatz sowie das Programm für die Durchführung der PCR waren dabei für jedes Exon spezifisch und können aus den Abbildungen 6 und 7 entnommen werden.

Primer DES	1_1	1_2	2 – 3	4 – 5	6	7	8 – 9
H <sub>2</sub> O (µl)	12,87	13,62	17,87	13,65	13,87	16,38	14,62
10xPCR-Puffer mit 15mM MgCl <sub>2</sub> (µl)			2,50			2,50	
10xPCR-Puffer ohne MgCl <sub>2</sub> (µl)	2,50	2,50		2,50	2,50		2,50
MgCl <sub>2</sub> 25mM (µl)	5,00	3,00		3,00	4,00		2,00
dNTP 5mM (µl)	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
DMSO (µl)		1,25		1,25			1,25
Primer f/r (µl)	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75
Taq-Polymerase 5U/µl (µl)	0,13	0,13	0,13	0,13	0,13	0,13	0,13
DNA (µl)	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Annealing-Temp (°C)	61	63	61	61	61	61	60

Abb. 7: Zusammensetzung der verschiedenen PCR-Ansätze mit Angabe der gewählten Annealing-Temperatur, aufgelistet nach den verwendeten Primerkombinationen und Exons.

## 2.4 Denaturierende Gradientengel-Elektrophorese (DGGE)

Die PCR-Produkte wurden mittels denaturierender Gradientengel-Elektrophorese (DGGE) auf Vorliegen einer Mutation untersucht. Bei der DGGE handelt es sich um eine genetische Analysetechnik, die für den Nachweis von Basensubstitutionen, Deletionen beziehungsweise Insertionen in PCR-amplifizierter DNA verwendet wird. Die Detektion einer Sequenzveränderung ist bei Produkten gleicher Länge unter anderem auf Basis des unterschiedlichen Bindungsverhaltens der in der DNA vorkommenden Basenpaare G-C (drei Wasserstoffbrückenbindungen pro Paar) und A-T (zwei Wasserstoffbrückenbindungen pro Paar) zu erreichen. Die Proben wurden dazu in einem Gel mit ansteigendem DNA-denaturierenden Gradienten elektrophoretisch aufgetrennt, wobei es

aufgrund der unterschiedlichen Laufgeschwindigkeiten von doppelsträngiger zu einzelsträngiger DNA im Gel zu einer Auftrennung von Proben mit verschiedenen Sequenzen kommt. Vereinfacht läuft eine Probe mit einer Heteroduplex-Struktur (doppelsträngiges Nukleinsäuremolekül mit Einzelsträngen unterschiedlicher Sequenz) bei hohen Temperaturen und denaturierenden Gelen langsamer und denaturiert früher als eine Homoduplex-Struktur (doppelsträngiges Nukleinsäuremolekül mit Einzelsträngen gleicher Sequenz). Dadurch wird eine Heteroduplex-Struktur bei der Elektrophorese detektierbar (Murken et al., 2006). In dieser Studie wurden je nach PCR-Produkt 8-10%-ige Polyacrylamid-Gele nach folgendem Protokoll gegossen:

0%ig		80%ig	
53 ml	Acrylamid 40 (37,5:1)	53 ml	
5 ml	20x GTG-Puffer	5 ml	
23 ml	Glycerin 87%ig	23 ml	
	Formamid >99,5%	64 ml	
	Harnstoff	67,2 g	
	H <sub>2</sub> O auffüllen auf 200 ml		
200 ml	Gesamtvolumen	200 ml	

Abb. 8: Ansatz für die Ausgangslösungen der Polyacrylamid-Gele.

(GTG = Glycerol-Tolerant-Gel)

Die Lagerung der Lösungen erfolgte im Kühlschrank bei 4°C. Aus den Lösungen mit verschiedener, denaturierender Wirkung wurden Gele mit einem Gradienten von 20-60% und 20-40% gegossen. Dazu wurden die Lösungen in 20ml-Spritzen gefüllt und mit Hilfe eines Infusionssystems von oben in die zuvor gründlich mit Ethanol gereinigten und auf Dichtigkeit überprüften Gelkammern mit Hilfe des BioRad-Applikators gefüllt. Abschließend wurde ein 32-zahniger Kamm zur Bildung der Probenkammern eingesetzt. Unter Zusatz von 180 µl 10%-igem APS und 18 µl TEMED auf 200 ml Volumen polymerisierten die Gele binnen 90 Minuten.

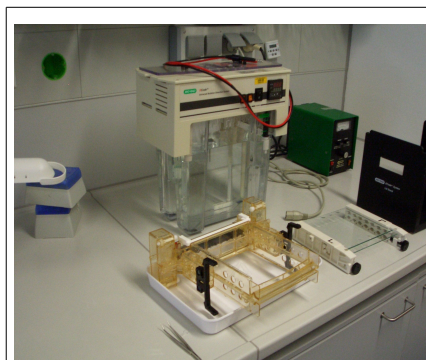
Die polymerisierten Gele wurden nach Entfernung der Kämmen in die vorgesehene Vorrichtung der BioRad-Apparatur DCode-Universal-Mutation-Detection-System gespannt und auf Dichtigkeit hin überprüft. Anschließend wurden die Probenkammern mit 0,5x GTG-Puffer-Lösung gefüllt und gespült. Je nach Qualität des PCR-Produktes wurden die Probenkammern mit 2-4 µl PCR-Produkt und entsprechend 2-4 µl DNA-Probenpuffer zu einem Gesamtvolumen von 6 µl gefüllt, die Gelkammern mitsamt Vorrichtung in das mit 0,5x Laufpuffer gefüllte und auf die je nach Versuchslauf spezifisch vorgeheizte BioRad-Apparatur DCode-Universal-Mutation-Detection-System eingehängt. Die Elektrophorese

erfolgte bei einer Spannung von 120 V über eine vom PCR-Amplifikat abhängige Zeitdauer von 3,5 bis maximal 15 Stunden. Einzelheiten sind der Tabelle in Abbildung 9 zu entnehmen.

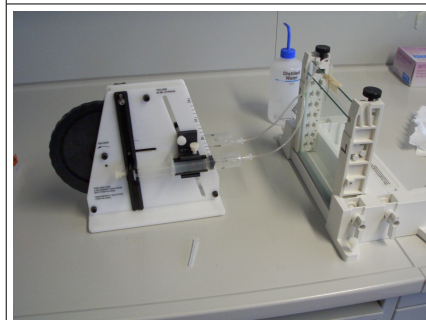
Versuchsaufbau DGGE						
Exon	Gel	Gradient	Temp (°C)	Laufzeit (h)	Puffer 0,5x	
1_1	8% AA	20-60%	55	3,5	GTG	
1_2	8% AA	20-40%	47	4,0	GTG	
2 – 3	8% AA	20-60%	60	15,0	TAE	
4 – 5	8% AA	20-60%	55	4,5	GTG	
6	8% AA	20-60%	55	4,5	GTG	
7	10% AA	20-60%	65	3,5	GTG	

Abb. 9: Laufzeiten, Temperaturbedingungen, Puffer und Gradienten bei der Elektrophorese der untersuchten Exons mittels DGGE.

Nach erfolgter Elektrophorese wurden die Gelkammern geöffnet, das Gel über 3 min in einer Ethidiumbromid-Lösung gefärbt und anschließend 3 min gewaschen. Die Auswertung der Proben erfolgte mit einem Gel-Dokumentationssystem (BioRad).



Das Bio-Rad Dcode-Universal-Mutation-Detection-System in vorbereitetem Zustand. Gezeigt ist im Hintergrund die Stromquelle Bio-Rad Modell 160/1,6, vorne eine Einspannvorrichtung für Gelkammern, daneben eine leere Gelkammer.



Die Gießvorrichtung für die Gradientengele: Nachdem die Gelkammer mittels destilliertem Wasser auf ihre Dichtigkeit überprüft wurde, wurden die Gelkammern mittels gezeigtem Infusionssystem mit der zuvor mit TEMED und APS versetzten Lösung (denaturierend/ nicht denaturierend) zum entsprechenden Gradientengel gegossen. Abschließend wurde ein 32-zahniger Kamm eingesetzt.

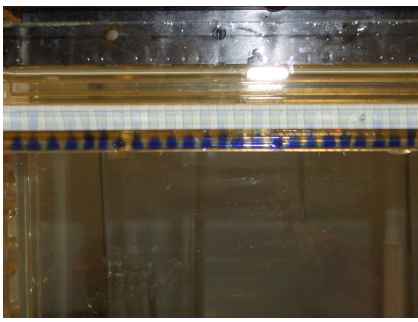

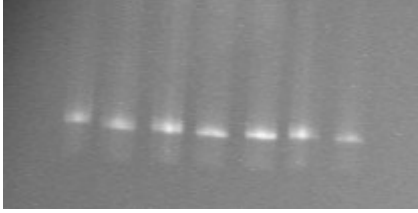
	<p>Nach der mindestens 90 min dauernden Polymerisation der Gele wurde der 32-zählige Kamm entfernt und die Gelkammer in die entsprechende Einspannvorrichtung montiert und in die vorgeheizte Pufferlösung des Dcode-Systems eingehängt. Nach Befüllen der Gelkammern (Bild) wurde die Stromquelle mit dem System verbunden und die denaturierende Gradientengel-Elektrophorese durchgeführt.</p>
	<p>Nach erfolgter Elektrophorese wurden die Gelkammern aus der Einspannvorrichtung gelöst und geöffnet. Die Gele wurden in Ethidiumbromid-Lösung über 3 min gefärbt und zur Auswertung in das PC-gestützte Geldokumentationssystem gegeben.</p>
	<p>Unter Bestrahlung mit UV-Licht ergab sich nach Beendigung des Gellaufes ein auswertbares Ergebnis der Gelelektrophorese, welches digital zur weiteren Auswertung gespeichert wurde.</p>

Abb. 10: Schematischer Aufbau und Ablauf der DGGE.

## 2.5 Einzelstrang-Konformations-Polymorphismus-Analyse

Bei der Einzelstrang-Konformations-Polymorphismus-Analyse (single-strand conformation polymorphism analysis, SSCP) handelt es sich um ein genetisches Analyseverfahren, bei dem die in der PCR entstandenen DNA-Doppelstränge nach Denaturierung bei 95°C zu Einzelsträngen aufgetrennt werden. Die DNA-Einzelstränge werden dann in einem nicht denaturierenden Gel elektrophoretisch getrennt und anschließend in einem Ethidiumbromid-Bad gefärbt.

Mit der SSCP-Methode wurden die PCR-Amplifikate der Primer Des 1\_2 und Des 2-3 analysiert. Die Ansätze für die PCR waren dabei identisch zu den Ansätzen, die für die DGGE-Analyse genutzt wurden. Details zu den gewählten PCR-Bedingungen können Abbildung 7 entnommen werden. Die so befüllten Ansätze wurden in den PCR-Cyclern den Abbildungen 11 und 12 zu entnehmenden Programmen unterzogen.

	Temperatur in °C	Zeitdauer in Minuten
Initiale Denaturierung	95	10,5
Zyklus x35		
- Denaturierung	95	0,5
- Annealing	65	0,5
- Elongation	72	0,75
Abschließende Elongation	72	7,0

Abb. 11: Zeitlicher Ablauf und verwendete Temperatureinstellungen für die PCR Des 1\_2.

	Temperatur in °C	Zeitdauer in Minuten
Initiale Denaturierung	95	10,5
Zyklus x40		
- Denaturierung	95	0,5
- Annealing	60	0,5
- Elongation	72	0,75
Abschließende Elongation	72	7,0

Abb. 12: Zeitlicher Ablauf und verwendete Temperatureinstellungen für die PCR Des 2-3.

Für die SSCP-Analyse wurde ein nicht-denaturierendes Gel bestehend aus insgesamt 40 ml mit folgendem Ansatz verwendet: 7% Acrylamid, 1x TBE-Puffer und Zusatz von 360 µl TEMED und 36 µl APS. Die 5 min dauernde Denaturierung bei 95°C wurde unmittelbar vor der Gelelektrophorese durchgeführt, wobei die Proben nach der Denaturierung sofort auf Eis gekühlt und anschließend in die Gelkammern gegeben wurden. Die Elektrophorese wurde bei einer Temperatur von 4°C im Kühlraum bei einer Laufzeit von 6,5 h und einer angelegten Spannung von 300 V durchgeführt.

## 2.6. Berechnung der Pathogenität von Mutationen

Nach der Sequenzierung einer detektierten Mutation schloss sich die Berechnung der Pathogenität mit Polyphen 2.0 an. Hierbei handelt es sich um ein Programm, das die Pathogenität einer Mutation auf Basis der Datenbank DSSP (Dictionary of secondary structure in proteins) durch Analyse des Einflusses einer Sequenzveränderung auf die Proteinstruktur berechnet. Die hohe Validität des Verfahrens ergibt sich dabei aus dem Abgleich mit bekannten und charakterisierten menschlichen Mutationen aus den Datenbanken HumDiv und HumVar (Adzhubei et al., 2010)

## 2.7 Materialliste

### PCR-Cycler:

Applied Biosystems GeneAmp PCR System 2700

MWG-Biotech Primus 96plus

### DGGE/Stromquelle:

Bio-Rad Dcode-Universal-Mutation-Detection-System

Bio-Rad Modell 160/1,6 Power Supply

### Chemikalien:

5-Prime DNA Gel Loading Buffer 10x

5-Prime Water, Mol Biograde DNase-, RNase- und Protease-frei

Amersham Biosciences PlusOne TEMED

Applied Biosystems AmpliTaq Gold 1000units 5U/ $\mu$ l

Applied Biosystems 10x PCR-Buffer II ohne  $MgCl_2$

Applied Biosystems 10x PCR-Buffer mit 15 mM  $MgCl_2$

Applied Biosystems  $MgCl_2$ -Solution 25 mM

Applied Biosystems dATP 10 mM

Applied Biosystems dCTP 10 mM

Applied Biosystems dGTP 10 mM

Applied Biosystems dTTP 10 mM

Bio-Rad Harnstoff

Bio-Rad APS

Brand Ethanol

Delta Select Aqua ad iniectabilia

Invitrogen Ultra Pure 10x TBE-Buffer

Invitrogen Ultra Pure Agarose

Merck Glycerin etwa 87% zur Analyse

Roth Rotiophorese Gel 40 (37,5:1)

Roth Formamid deionisiert >99,5% RNase/DNase-frei

Sigma Dimethylsulphoxid (DMSO) Hybri-max

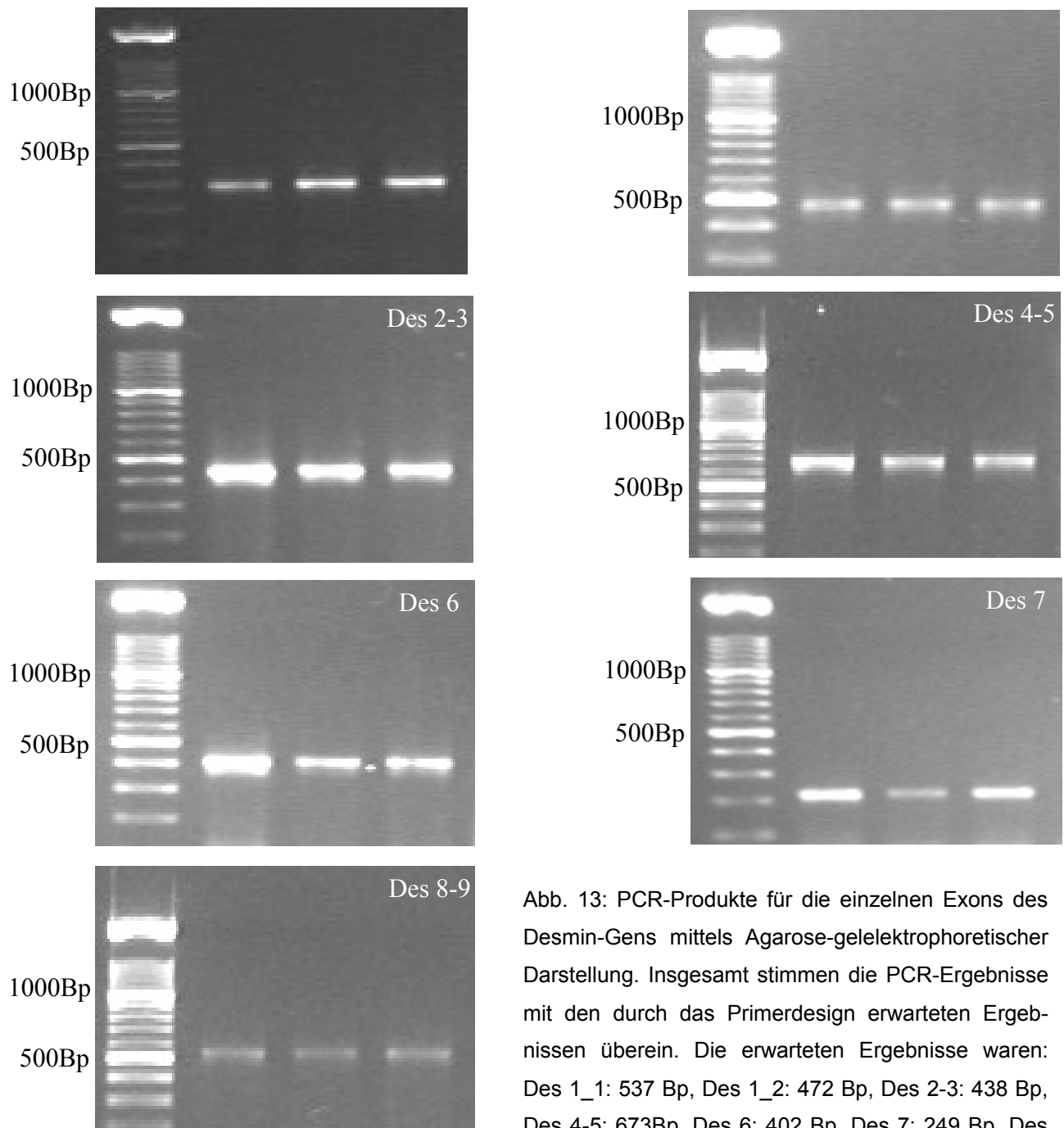
USB 20x Glycerol Tolerant Gel (GTG) Buffer Ultrapure MB Grade  
(1,78 M Tris, 0,57 M Taurin, 0,01 M EDTA)

USB 10x Tris-Acetat-EDTA (TAE) Buffer Ultrapure MB Grade  
(0,4 M Tris, 0,2 M Essigsäure, 0,01 M EDTA )

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Ergebnisse aus den Vorversuchen

Im ersten Schritt war es nötig, den Ansatz für die PCR sowie das jeweilige Programm für die Amplifikation der PCR-Fragmente aus genomischem Material zu optimieren.





In Abbildung 13 sind typische Ergebnisse von durchgeführten Agarose-Gelelektrophoreseläufen der verschiedenen Exons des Desmin-Gens nach Optimierung des PCR-Ansatzes sowie des PCR-Programmes dargestellt, wie sie als Erfolgskontrolle nach Amplifikation im PCR-Cycler und vor der DGGE durchgeführt worden ist.

Die Optimierung der DGGE erwies sich aufgrund der verschiedenen Möglichkeiten der Einstellung von Temperatur, Laufzeit, Gelgradient und Acrylamid-Anteil als technisch schwierig, da die große Anzahl an Variablen umfangreiche Vorversuche erforderte. Ein Wechsel der verwendeten Laufpuffer (GTG oder TAE) erwies sich hingegen als nicht geeignet, das Ergebnis zu beeinflussen.

Um die für jedes Exon optimalen Einstellungen der DGGE und den benötigten Gelgradienten zu ermitteln, wurden zunächst Laufzeittests durchgeführt. Hierzu wurden die Ergebnisse bei der Elektrophorese verschiedener Acrylamid-Gehalte der Gele (zwischen 6 und 10%), Gelgradienten (0 - 80%), Temperaturen (45 - 70°C) und Laufzeiten (1,5 - 15 h) miteinander verglichen. Gewählt wurde letztendlich eine Kombination aus optimaler Temperatur, Gradient und Laufzeit, bei der die beste Auftrennung erreicht wurde.

### 3.2 Ergebnisse der DGGE

Untersucht wurden die aufgereinigten, mittels PCR amplifizierten Proben durch das Verfahren der DGGE, wobei bis zu 32 Proben in einem Gel gemeinsam einem Elektrophoreselauf unterzogen wurden (Abb. 14 und 15). Proben, die nach der Elektrophorese ein gegenüber der Mehrzahl der Proben abweichendes Laufverhalten der PCR-Amplifikate im Gel hatten, wurden sequenziert.

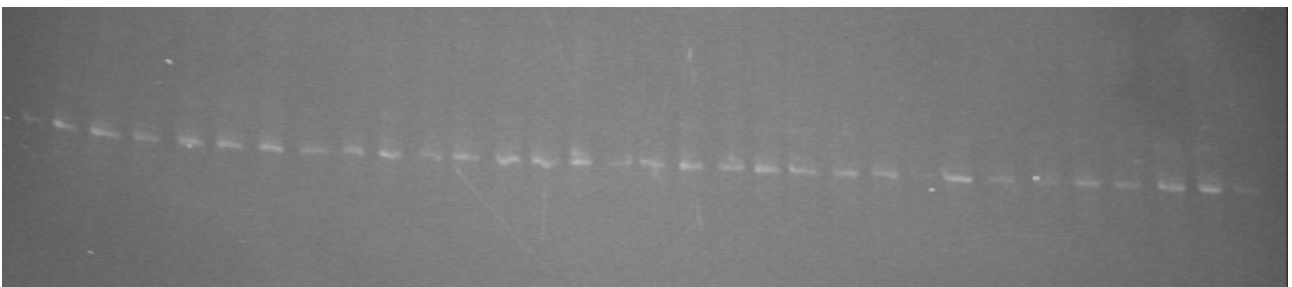


Abb. 14: Charakteristisches Ergebnis der DGGE für DES 1\_1. Es zeigen sich keine Auffälligkeiten im Laufverhalten der einzelnen PCR-Amplifikate.

Im Gegensatz zur SSCP stellten sich mittels DGGE keine Unterschiede im Laufverhalten der untersuchten Proben des Exons 1\_2 ein. Ein Nachweis des Polymorphismus p.L136L gelang mittels denaturierender Gradienten-Gel-Elektrophorese nicht.

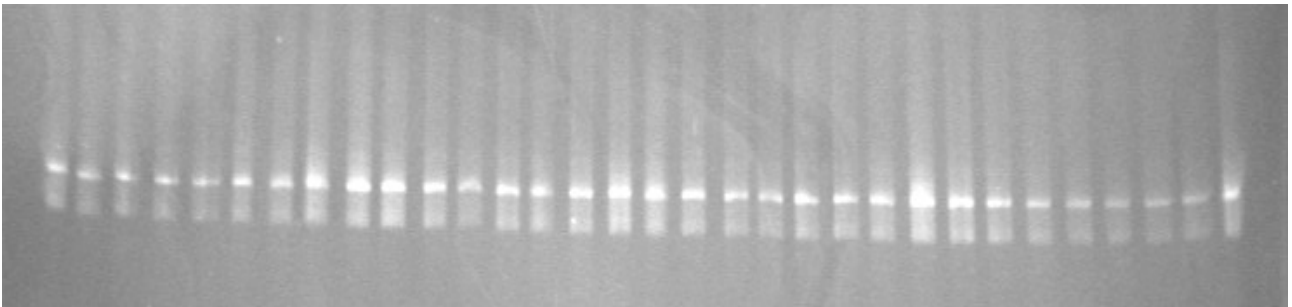


Abb. 15: Ergebnis der DGGE für DES 1\_2 ohne abweichendes Laufverhalten der einzelnen PCR-Amplifikate.

Allerdings gelang der Nachweis der Mutation p.A213V in zwei der untersuchten DCM-Patienten in den Exons 2-3 mittels DGGE. Die Abbildung 16 zeigt das Ergebnis der zugehörigen gelelektrophoretischen Auftrennung der PCR-Produkte, das im Elektropherogramm durch Sequenzierung (Abb. 17) bestätigt wurde. Die Berechnung der potentiellen Pathogenität der Punktmutation mittels Polyphen erbrachte vage Hinweise auf eine krankheitsrelevante Ursache der p.A213V-Mutation (Abb. 18).

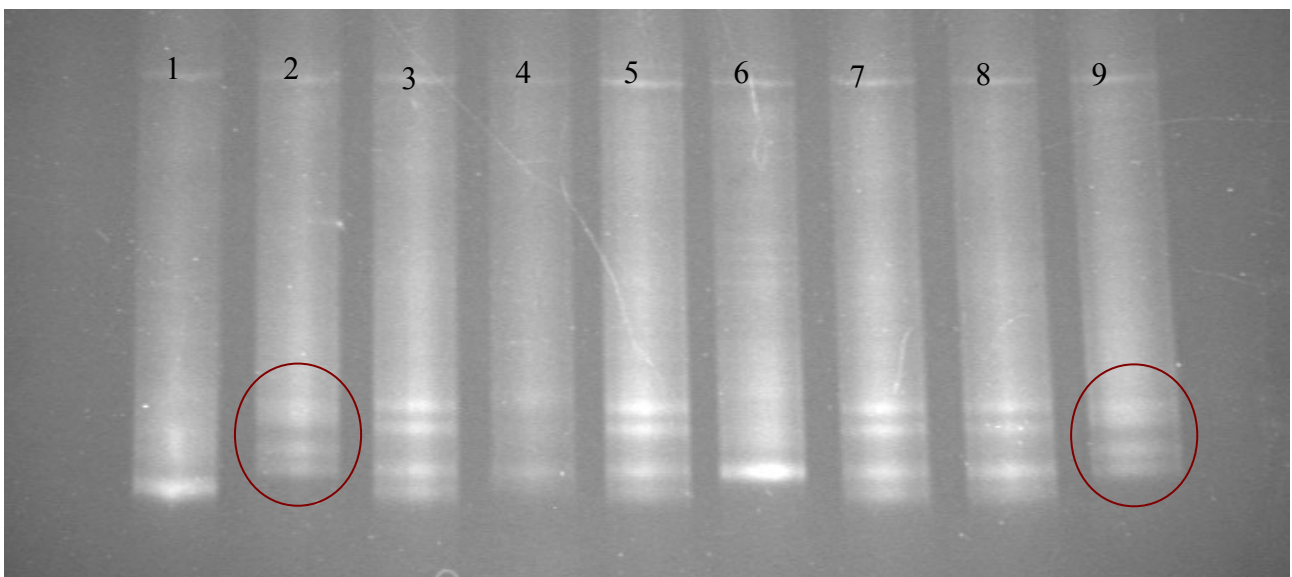


Abb. 16: Ergebnisse der DGGE zum Nachweis von Basenveränderungen in PCR-Amplifikaten, die die Exons 2-3 des Desmin-Gens umfassen. Gezeigt sind die gefundenen Abweichungen im Laufverhalten der PCR-Amplifikate von verschiedenen Patienten. Probennummern 1, 3, 4, 5, 6, 7 und 8 zeigen den Wildtyp, in den Proben 3, 5, 7 und 8 wurde durch nachfolgende Sequenzierung ein Polymorphismus im Intron (c.579-38C>T) nachgewiesen. Probennummern 2 und 9 zeigen die gefundene Mutation p.A213V.

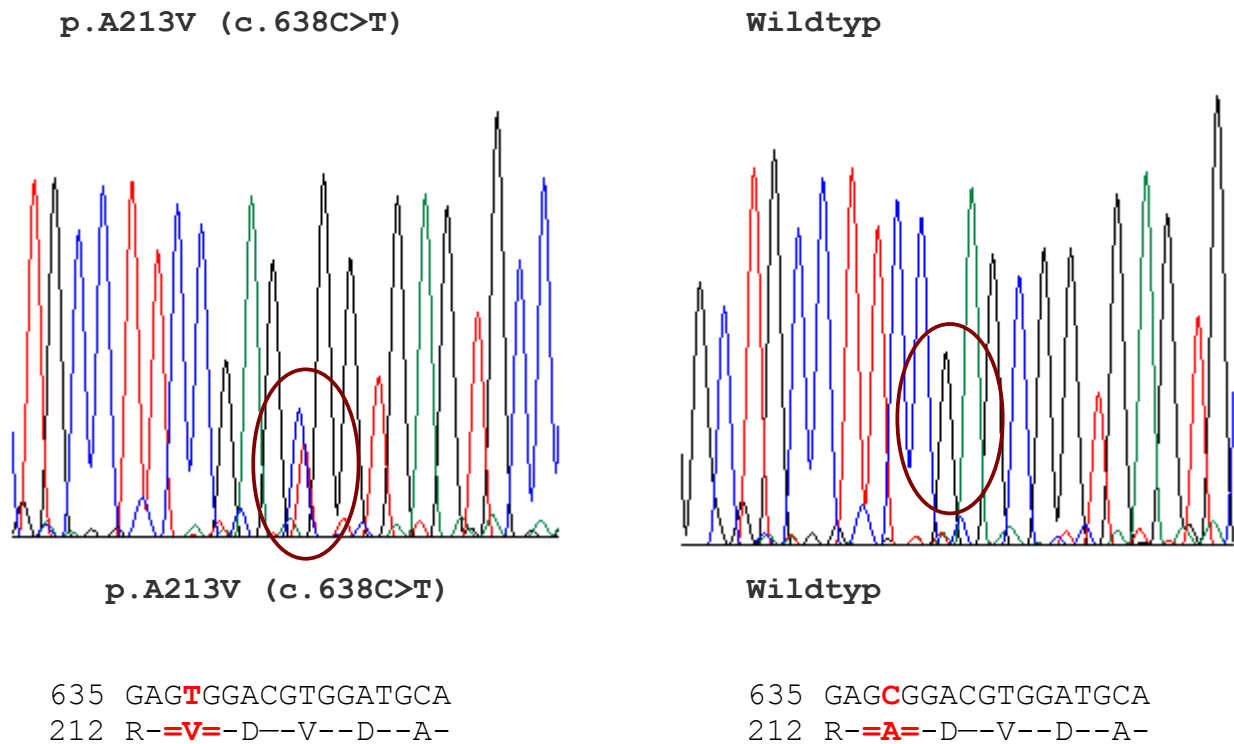


Abb. 17: Sequenzergebnis mit Nachweis einer Punktmutation im 1B-Segment von Desmin (Des 2-3) und der zugehörigen Wildtyp-Sequenz. Es stellt sich eine heterozygote Mutation an Position 638 mit dem Basenaustausch C>T dar.

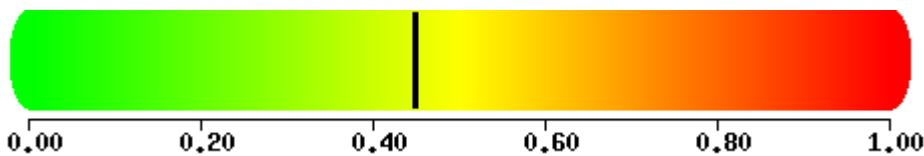
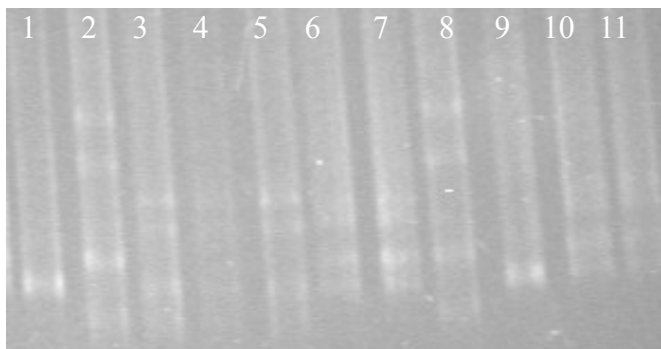


Abb. 18: Berechnung der potentiellen Pathogenität mittels Polyphen für die Mutation p.A213V. Auf einer Skala von 0,00 (keine Pathogenität) bis 1,00 (sichere Pathogenität) errechnet sich die Pathogenität der Desmin-Mutation p.A213V mit einem Wert von 0.450 und ist damit als potentiell pathogenetisch relevant einzustufen (Sensitivität: 0.89; Spezifität: 0.90) (Polyphen 2.0, Juli 2011).

Nach Detektion einer Mutation p.A213V bei den Patienten B-002330-X und B-011583-6 wurde die Möglichkeit geprüft, dass auch Familienangehörige erkrankt sind. Bei dem Patienten B-002330-X konnte ein Familienscreening durchgeführt werden und es wurden 10 weitere Proben auf das Vorliegen der Mutation p.A213V untersucht. Ergänzend zu der Mutation p.A213V wurde in einigen Proben eine Sequenzveränderung im Intron c.579-38C>T ohne pathologischen Wert gefunden und ein Stammbaum erstellt.



- 1 = IV.9 WT
- 2 = IV.2 c.638C>T + c.579-38C>T
- 3 = III.5 c.579-38C>T
- 4 = III.4 c.579-38C>T
- 5 = IV.6 c.579-38C>T
- 6 = IV.3 c.638C>T
- 7 = III.3 c.638C>T
- 8 = IV.1 c.638C>T + c.579-38C>T
- 9 = IV.8 WT
- 10 = III.6 c.638C>T
- 11 = III.2 c.638C>T B-002330-X

Abb. 19: Familienscreening von Indexpatient B-002330-X mit Nachweis der Mutation p.A213V (c.638C>T) und des Polymorphismus c.579-38C>T. Das PCR-Produkt des Indexpatienten (III.2) wurde in Bahn 11 aufgetragen. Die Namensgebung der Familienmitglieder entspricht den Angaben im Stammbaum in Abbildung 20.

Insbesondere am Stammbaum ist ersichtlich, dass sowohl gesunde als auch erkrankte Familienmitglieder Mutationsträger sind. Es zeigt sich eine weite Verbreitung der Mutation p.A213V bei den Familienangehörigen des Indexpatienten, wobei festzustellen ist, dass die wenigsten betroffenen Individuen an einer DCM erkrankt sind.

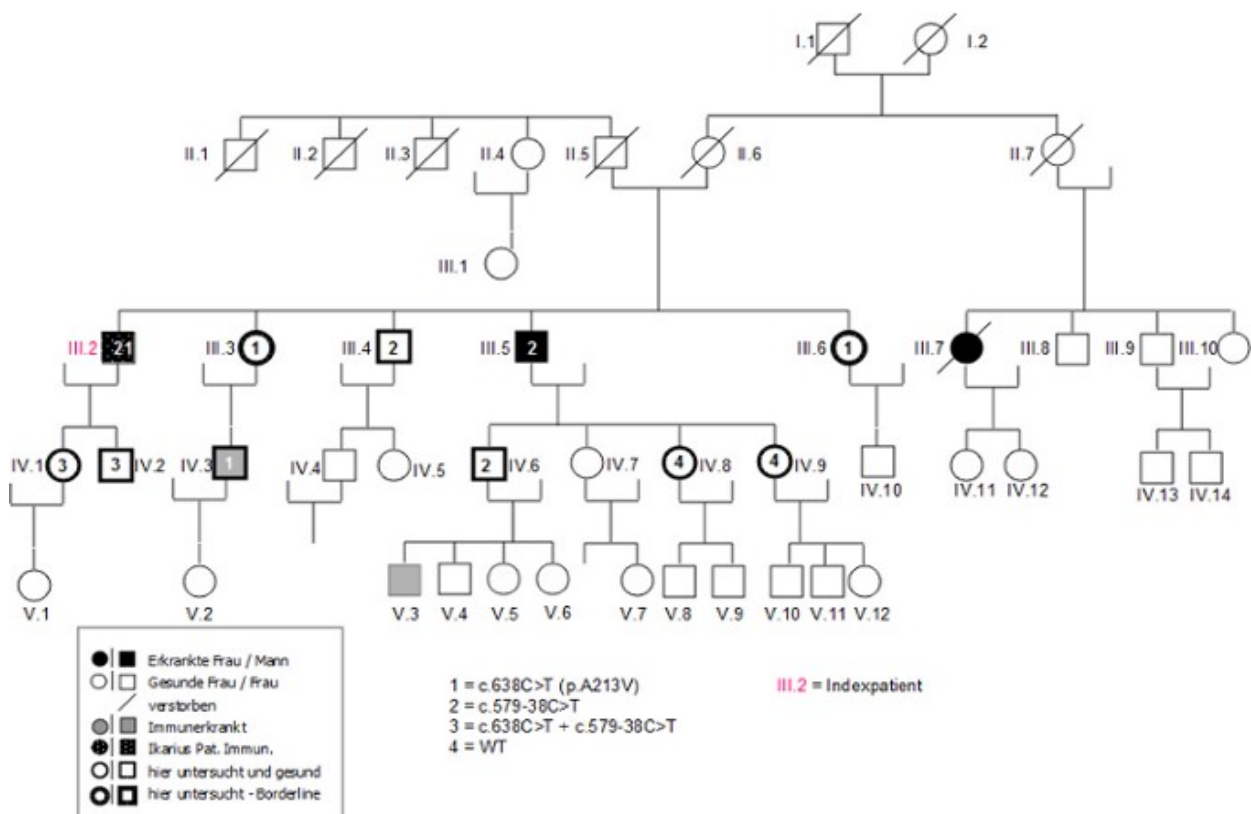


Abb. 20: Stammbaum von Patient B-002330-X (III.2) nach Familienscreening. Es zeigen sich sowohl erkrankte als auch gesunde Träger der Mutation p.A213V, so dass von niedrig pathogenen Mutation auszugehen ist.

## DES 4-5

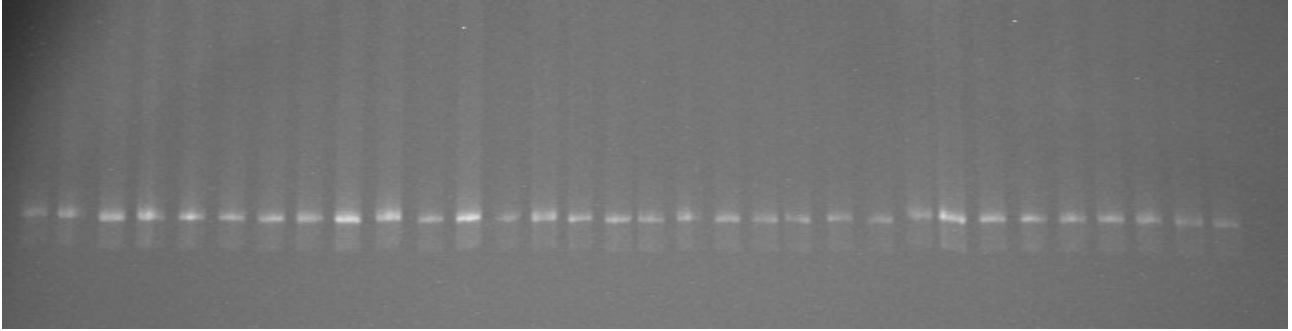


Abb. 21: Typisches Ergebnis der DGGE für die Desmin-Exons 4-5 ohne Nachweis von Auffälligkeiten im gelelektrophoretischen Laufverhalten der einzelnen PCR-Proben.

## DES 6

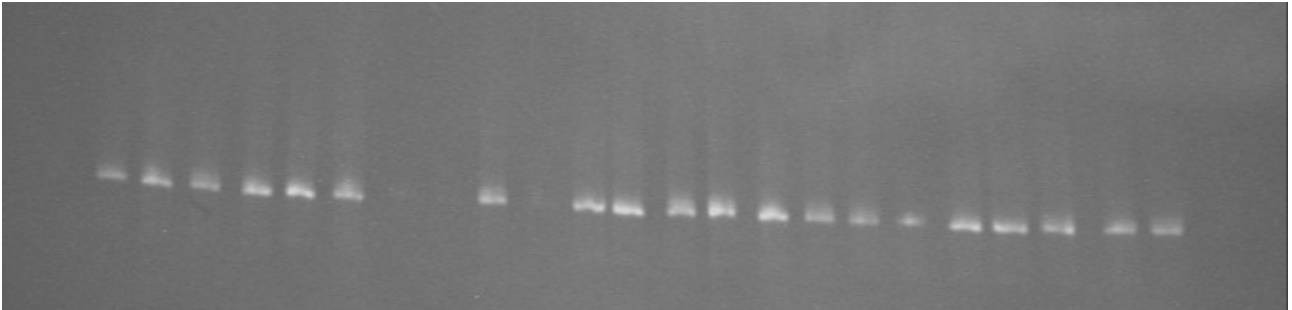


Abb. 22: Charakteristisches Ergebnis der DGGE für das Desmin-Exon 6. Es zeigen sich keine Auffälligkeiten im Laufverhalten der einzelnen Proben.

## DES 7

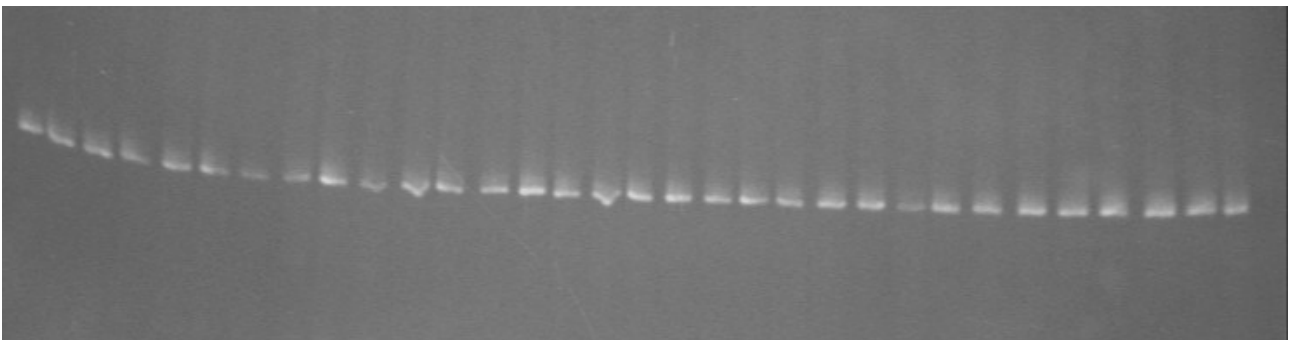


Abb. 23: Gelelektrophoretisches Ergebnis der DGGE für das Desmin-Exon 7. Die dargestellten Banden unterscheiden sich nicht in ihrem Laufverhalten.

## DES 8-9

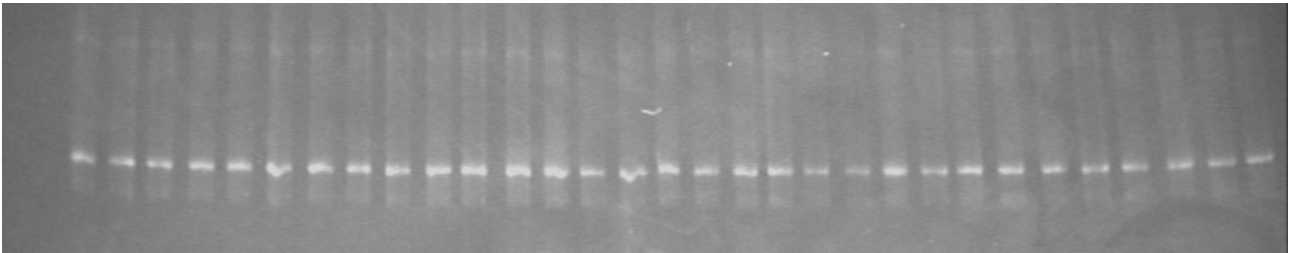


Abb. 24: Typisches Ergebnis der DGGE für die Desmin-Exons 8-9 mit fehlendem Nachweis auffälligen gelelektrophoretischen Laufverhaltens.

Insgesamt war es möglich, 1622 von 1645 (98,6%) untersuchten PCR-Proben mittels DGGE darzustellen. Die Aufschlüsselung auf die verschiedenen Exons ist dabei der folgenden Abbildung 25 zu entnehmen.

Primer	darstellbare Proben Von 235
DES 1_1	232
DES 1_2	229
DES 2-3	232
DES 4-5	230
DES 6	231
DES 7	235

Abb. 25: Übersicht zur Probenanzahl, die mittels DGGE untersucht werden konnten.

Die 235 Patientenproben, die die ursprüngliche Studienkohorte bildeten, entsprachen einer heterogenen Gruppe von Patienten mit der Erkrankung einer dilatativen Kardiomyopathie. Hinsichtlich ihrer klinischen Phänotypen waren die Patienten bekannt; eine Charakterisierung der Patienten mit detektierter Mutation p.A213V gegenüber den mutationsfreien Patienten ergab keine Auffälligkeiten. Auf eine Beschreibung der sechs Patienten mit dem stillen Polymorphismus p.L136L wurde aufgrund der nicht vorhandenen Änderung der Aminosäuresequenz im Protein des Desmin verzichtet.

	alle Patienten	B-002330-X	B-011583-6
Alter bei Studieneinschluss	51+/-12	56	53
Geschlechterverhältnis m:w	4:1	m	m
Ejektionsfraktion in %	35+/-13	42	52
Gewicht in kgKG	86+/-18	78	79
Größe in cm	176+/-9	178	179
Studieneinschluss	1989 – 2006	2004	2000
gesicherte fDCM	31	ja	ja
NYHA-Stadium	2,5+/-0,8	3	2
Ruheherzfrequenz /min	78+/-17	70	85

Abb. 26: Charakterisierung der beiden Indexpatienten mit der p.A213V-Mutation unter Angabe der erhobenen klinischen Parameter sowie der entsprechenden Mittelwerte und Standardabweichungen des Gesamtkollektivs.

### 3.3 Ergebnisse der SSCP-Analyse

Mittels SSCP konnte ein abweichendes Laufverhalten von 6 PCR-Amplifikaten im Exon 1 detektiert werden. Die Sequenzierung erbrachte den Nachweis des Polymorphismus p.L136L (c.408C>T). Bei fehlendem Aminosäureaustausch in der Proteinsequenz konnte auf eine Berechnung der Pathogenität des Polymorphismus verzichtet werden.

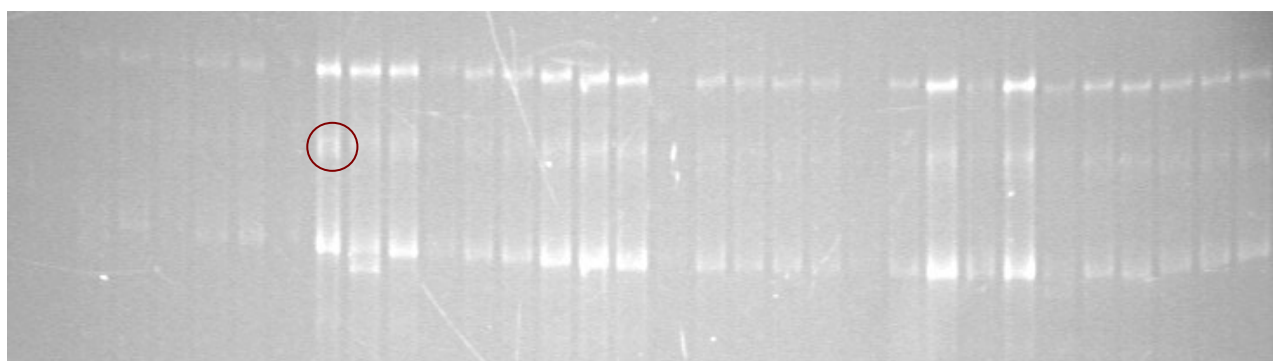
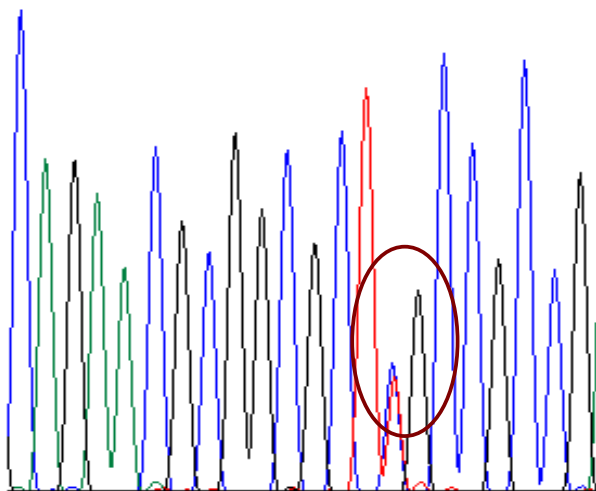
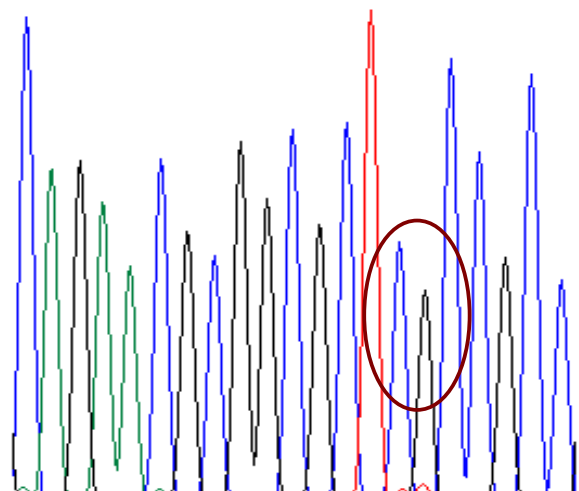


Abb. 27: Ergebnisse der SSCP-Analyse bei DES 1\_2: Gezeigt ist das abweichende Laufverhalten eines PCR-Amplifikates mit dem Polymorphismus p.L136L (c.408C>T).

p.L136L (c.408C>T)



Wildtyp



p.L136L (c.408C>T)

395 AGAACGCGGCGCT**T**GCC  
132 Q--N--A--A--**L**--A--

Wildtyp:

395 AGAACGCGGCGCT**C**GCC  
132 Q--N--A--A--**L**--A--

Abb. 28: Sequenzierung des Desmin-Exons 1\_2 mit Nachweis der synonymen Mutation p.L136L. Im Elektropherogramm erkennt man eine heterozygote Mutation in Position 408 mit dem Basenaustausch C>T, entsprechend dem nicht-pathogenen Polymorphismus p.L136L.

Insgesamt konnte der Polymorphismus p.L136L bei den sechs Patienten mit den Probennummern B-002234-3, B-010828-8, B-002323-4, B-002330-X, B-004670-X und B-002335-9 nachgewiesen werden. Die mittels DGGE nachgewiesene Mutation p.A213V konnte mit der Methode der SSCP nicht detektiert werden.



## 4. Diskussion

In der vorliegenden Studie wurden Patienten aus einem Kollektiv mit klinisch manifester dilatativer Kardiomyopathie, teilweise unbekannter Ursache, auf das Vorliegen von Mutationen im Gen des Desmin getestet. Durch angiographische Voruntersuchungen war bei allen Studienteilnehmern vor Einschluss in die Studie eine ischämische Genese der Herzinsuffizienz ausgeschlossen worden. Da nach derzeitiger Studienlage angenommen wird, dass Mutationen im Desmin-Gen für 1-2% aller familiären dilatativen Kardiomyopathien verantwortlich sind (Goldfarb et al., 2008; Taylor et al., 2007) und Desmin in der Herzmuskulatur mit einem Anteil von 2% aller zellulären Proteine stark exprimiert ist (Paulin et al., 2004a; Bär et al., 2007), war die Möglichkeit, in unserem Patientenkollektiv mit familiärer und spontaner DCM eine neuartige Mutation in kodierenden Bereichen des Desmin-Gens zu finden, somit gegeben. Die Resultate aus der vorliegenden genetischen Studie ergaben unter den 235 untersuchten Proben neben dem Polymorphismus p.L136L bei insgesamt sechs Patienten auch die bekannte Mutation p.A213V, die bei zwei Patienten detektiert wurde. Darüber hinaus wurden keine weiteren Mutationen oder Polymorphismen in den untersuchten Exonsequenzen des Desmin-Gens durch elektrophoretisches Screening identifiziert.

Da es sich beim Desmin um ein ubiquitäres Muskelprotein handelt, welches sowohl in der Herz-, Skelett- und glatten Muskulatur exprimiert wird, kann eine Mutation im Gen des Desmin multiple klinische Phänotypen hervorbringen. Es war somit zu erwarten, dass Patienten in unserer Kohorte mit dem Nachweis einer Mutation im Desmin-Gen möglicherweise keinen rein kardialen Phänotyp, sondern auch eine Beteiligung skelettaler und/oder glatter Muskulatur zeigten. Erkrankungen, die auf Mutationen im Desmin- oder  $\alpha\beta$ -Crystallin-Gen sowie möglicherweise auch anderen Genen zurückzuführen sind (Goldfarb et al., 2008), werden daher als Desminopathien bezeichnet, einer Untergruppe der myofibrillären Myopathie (MFM) (Nakano et al., 1996; Engel et al., 1999). Oftmals ist das erste Symptom das Auftreten einer Kardiomyopathie lange vor einer klinisch nachweisbaren Beteiligung der Skelettmuskulatur (Dalakas et al., 2000). Weitere klinische Frühsymptome wie Störungen des Verdauungssystems werden leicht übersehen beziehungsweise führen diagnostisch auf andere Spuren (Bär et al., 2007). Morphologische Kennzeichen sind Desmin-immunoreaktive Ablagerungen und Aggregationen von granulofilamentösem Material (Goebel et al., 1994; Selcen et al., 2004). Histologisch lassen sich in einigen Fällen eine Muskelfasernekrose, Inflammation, Regeneration und

pathologische Gruppierungen von Mitochondrien (Goudeau et al., 2006; Schröder et al., 2003; Bär et al., 2005a) sowie regelhaft Fibrose und Ersatz von Muskel- durch Fettzellen finden (Goebel et al., 1994; Park et al., 2000; Vrabie et al., 2005; Bär et al., 2005a; Carlsson et al., 2002). Ursache für das Auftreten einer Desminopathie sind dabei sowohl die namensgebenden Mutationen im Gen des Desmin als auch Mutationen im Gen des CRYAB, welches für  $\alpha\beta$ -Crystallin kodiert das als Chaperon für die Stabilisierung von Proteinen wie Desmin verantwortlich ist. Es verhindert dabei durch seine Anwesenheit die irreversible Aggregation von Desmin (Vicart et al., 1998; Wang et al., 2001b).

Je nach Art der ursächlichen Mutation treten bei autosomal dominanten Mutationen erste klinische Symptome einer Desminopathie im Lebensalter von 14–48 Jahren auf, bei rezessiven Formen auch deutlich früher und mit schnellerem Progress (Goldfarb et al., 2008). Das durchschnittliche Alter bei Erstmanifestation von Symptomen umfasst dabei die zweite und dritte Lebensdekade (Ahmad et al., 2005), was im Vergleich zu anderen Formen von Kardiomyopathien sehr früh ist. Gemeinsam ist den verschiedenen Formen einer Kardiomyopathie, die durch eine Desminopathie ausgelöst werden, eine hohe Frequenz der Beteiligung des Reizleitungssystem des Herzens, was auf den dortigen hohen Gehalt an Desmin zurückgeführt werden kann (Price, 1984; Bär et al., 2005a; Bär et al., 2005b; Arbustini et al., 2006; Pruszczyk et al., 2006). Insgesamt sind die Mechanismen, die bei der Erkrankung zu einer Kardiomyopathie führen allerdings noch nicht vollständig charakterisiert (Goldfarb et al., 2008). Histologisch gibt es zwischen der pathologisch veränderten Herz- und Skelettmuskulatur keinen Unterschied (Ariza et al., 1995). Als Ursache für das breite Spektrum an klinischen Erscheinungsbildern sind genetische Mechanismen zu diskutieren, die den Phänotyp auf unterschiedliche Weise beeinflussen. Dominante beziehungsweise rezessive und De-novo-Mutationen verursachen beispielsweise unterschiedliche Symptome. Ferner ist zu berücksichtigen, dass Desmin sowohl in der Skelett-, Herz- und glatten Muskulatur exprimiert wird und deshalb bei Schädigung eine Kombination mit unterschiedlichen klinischen Symptomen resultiert. Die Art und Lokalisierung der Mutation im Desmin-, CRYAB-Gen oder anderen Genen kann weitere phänotypische Modifikationen verursachen (Goldfarb et al., 2008).

Die Desminopathien stellen sich klinisch aufgrund einer großen Variabilität von skelettalen und kardialen Symptomen, der Schwere der Erkrankung, dem Alter bei Erstmanifestation von Beschwerden und dem Typ der ausgelösten Kardiomyopathie als schwer diagnostizierbar dar (Bär et al., 2007). Als Anhaltspunkte dienen die Anamnese von progressiver Muskelschwäche und höhergradigen AV-Blöcken. Aufgrund seiner linearen

molekularen Orientierung und der Möglichkeit mechanische Kraft in zwei Ebenen zu leiten kommt Desmin zudem in besonders hoher Konzentration im Diaphragma vor, so dass eine Beeinträchtigung der Atemmuskulatur zu erwarten ist (Boriek et al., 2001). Über die Diagnostik einer Herzinsuffizienz hinaus wird daher die Aufzeichnung von Elektromyogrammen (EMG), Lungenfunktionstests und bildgebenden Verfahren zur Beurteilung der jeweiligen Muskulatur empfohlen (Goldfarb et al., 2008).

Da es sich bei der Desminopathie um eine hereditäre Erkrankung handelt, ist eine genetische Untersuchung angeraten. Neben den bekannten ursächlichen Genen wie zum Beispiel  $\alpha$ -Crystallin und Desmin wird in den kommenden Jahren eine Zunahme des Nachweises pathogener Mutationen in Genen, deren Proteine mit dem Zytoskelett interagieren oder eine Kombination verschiedener Mutationen als Krankheitsursache erwartet (Goldfarb et al., 2008). Bei einer hohen Rate von Neumutationen ist ein genetisches Familienscreening bei verwandten Individuen ohne weitere klinische Zeichen allerdings nur bedingt empfehlenswert (Goldfarb et al., 2008).

Die besondere Bedeutung des Desmin-Proteins unter den Intermediärfilamenten ergibt sich aus der Beteiligung der Formation des Zytoskeletts und der mechanischen Stabilisierung der Zelle (Lazarides, 1980). Desmin interagiert dabei mit vielen anderen zytoskelettalen Strukturproteinen, welche Desminfilamente zu einem dreidimensionalen Netzwerk verbinden und so das Zytoskelett der Zelle verankern (Fuchs und Weber, 1994). Des Weiteren ist Desmin als das wichtigste muskuläre Intermediärfilament für die Verbindung angrenzender Myofibrillen verantwortlich (Lazarides, 1980). Diese Bindung geschieht auf Ebene der Z-Scheibe, bindet Myofibrillen auf Ebene der Kostamere mit dem Sarkolemma und stellt so eine Verbindung mit dem kontraktilem Apparat und den strukturellen Elementen der Zelle her (Lazarides, 1980; Schröder et al., 2000; Price et al., 1984). Es handelt sich dabei um ein bei Vertebraten hoch konserviertes Gen (Weber und Geissler, 1985), dessen Protein in vitro spontan Filamente ohne Beteiligung von Ko-Faktoren ausbildet (Parry und Steinert, 1995), sich in vivo allerdings noch Schritte der Phosphorylierung, Glykosylierung, Transglutaminisierung und andere bis zur Entfaltung der vollständigen Funktion anschließen (Herrmann und Aebi, 2004).

Der elementare Aufbau von intermediärfilamentösen Strukturen mit einer  $\alpha$ -helikalen Kernstruktur flankiert von N- und C-terminalen Head- und Tail-Domänen, die zusammen ein Homodimer bilden, ist auch beim Desmin-Protein zu finden (Burkhard et al., 2001). Enorme Unterschiede in der Head- und Tail-Domäne der verschiedenen Intermediärfilamente in Zusammenstellung und Länge der Aminosäuresequenz bei

ähnlicher Gestaltung der  $\alpha$ -Helixstruktur führen zu der Annahme, dass diese Domänen für Zell-spezifische Interaktionen verantwortlich sind (Heins und Aebi, 1994). Insbesondere für die Tail-Domäne beschreiben Hermann und Mitarbeiter die Bedeutung der longitudinalen Head-to-Tail-Tetramer-Anordnung (Herrmann et al., 1996) sowie eine Kontrollfunktion bei der lateralen Anlagerung, Stabilisation und Elongation von höher geordneten Filamentstrukturen. Die Hauptfunktion dieser Domänen liegt in der Etablierung eines zytoskelettalen Netzwerkes (Fuchs und Weber, 1994).

Im Gegensatz zu Head- und Tail-Domänen stellen sich die  $\alpha$ -helikalen Strukturen der Intermediärfilamente in ihrer Struktur ähnlich dar. Ihre Integrität ist von enormer Bedeutung für die Faltung des Proteins (Herrmann und Aebi, 2004). Sie enthalten als charakteristisches Merkmal ein sogenanntes „Stutter“, eine Wiederholung bestimmter Aminosäuresequenzen, welche die lokale Entwicklung und Faltung bestimmt und die Interaktionsmöglichkeiten des Proteins festlegt (Strelkov et al., 2002a; Strelkov et al., 2002b). Im Falle des Desmin-Gens ist die  $\alpha$ -Helix des Proteins die Hauptlokalisation aller bekannten Mutationen, wobei ca. 50% aller Mutationen auf die 2B-Helix entfallen (Goldfarb et al., 2008; Goudeau et al., 2006). Trotz der genetischen Ursache der hierdurch auftretenden Erkrankung ist eine positive Familienanamnese oftmals nicht zu erheben, da es sich wie bei der namensgebenden Desminopathie zu einem hohen Anteil der Mutationen im Desmin-Gen um Neumutationen handelt (Goldfarb et al., 2004).

Mutation	Domäne	Initiale Symptome	Literatur
p.S2I	Head	?	Selcen et al., 2004
p.S13F	Head	Skelettal und kardial	Pica et al., 2008
p.R16C	Head	skelettal	Arbustini et al., 2008
p.S46F	Head	?	Selcen et al., 2004
p.S46Y	Head	?	Selcen et al., 2004
p.E108K	1A	kardial	Taylor et al., 2007
p.N116S	1A	kardial	Klauke et al., 2010
p.R173_E179del	1B	Skelettal und kardial	Muñoz-Mármol et al., 1998
p.A213V	1B	kardial	Bowles et al., 2005
	1B	skelettal	Goudeau et al., 2006
	1B	kardial	Goudeau et al., 2006
p.K240fsX243	1B	skelettal	Schröder et al., 2003
p.E245D	1B	skelettal und kardial	Vrabie et al., 2005
p.D214_E245del	1B	kardial	Park et al., 2000
	1B	kardial	Arbustini et al., 2006
	1B	kardial	Shatunov et al., 2003

Mutation	Domäne	Initiale Symptome	Literatur
p.S298L	2B	kardial	Taylor et al., 2007
p.D312N	2B	kardial	Taylor et al., 2007
p.D314N	2B	kardial	Taylor et al., 2007
p.A337P	2B	skelettal	Dalakas et al., 2000
	2B	skelettal	Yuri et al., 2007
p.L338R	2B	skelettal	Goudeau et al., 2006
p.N342D	2B	skelettal	Dalakas et al., 2000
p.L345P	2B	skelettal	Sjoberg et al., 1999
p.R350P	2B	skelettal	Bär et al., 2005
p.R350W	2B	kardial	Taylor et al., 2007
p.R355P	2B	skelettal und kardial	Fidzianska et al., 2005
p.A357P	2B	skelettal	Dagvadorj et al., 2003
p.E359_S361del	2B	skelettal	Kamińska et al., 2004
p.A360P	2B	kardial	Dalakas et al., 2000
p.N366del	2B	skelettal	Kamińska et al., 2004
p.I367F	2B	skelettal	Olivé et al., 2007
p.L370P	2B	skelettal	Dagvadorj et al., 2003
	2B	skelettal	Arias et al., 2006
p.L385P	2B	skelettal	Suguwara et al., 2000
p.Q389P	2B	skelettal	Goudeau et al., 2001
p.L392P	2B	skelettal	Olivé et al., 2007
p.N393I	2B	kardial und skelettal	Goldfarb et al., 1998
p.D399Y	2B	skelettal	Goudeau et al., 2006
p.E401K	2B	skelettal und kardial	Goudeau et al., 2006
p.R406W	2B	kardial	Dagvadorj et al., 2004
	2B	skelettal	Dagvadorj et al., 2004
p.E413K	2B	kardial	Pruszyk et al., 2006
p.R415W	Tail	skelettal	Goldfarb et al., 2008
p.P419S	Tail	skelettal	Olivé et al., 2007
p.T442I	Tail	skelettal	Bär et al., 2007
p.K449T	Tail	?	Selcen et al., 2004
	Tail	skelettal	Goldfarb et al., 2008
p.I451M	Tail	kardial	Li et al., 1999
	Tail	skelettal	Dalakas et al., 2003
	Tail	kardial	Miyamoto et al., 2001
p.T453I	Tail	kardial	Arbustini et al., 2006
	Tail	skelettal	Goldfarb et al., 2008
p.R454W	Tail	kardial	Bär et al., 2007
p.V459I	Tail	kardial	Taylor et al., 2007
p.S460I	Tail	kardial	Bär et al., 2007

Abb. 29: Übersicht bekannter Desmin-Mutationen mit Angaben der entsprechenden Literaturstelle.

Insgesamt können nach derzeitiger Studienlage Mutationen im Gen des Desmin für 1-2% aller Fälle von familiärer dilatativer Kardiomyopathie verantwortlich gemacht werden (Taylor et al., 2007), wobei die auftretenden Symptome abhängig von der Lage der Mutation im Gen sind. Mutationen im 2B-Segment, wo sich ca. 50% aller bekannten Mutationen im Desmin-Gen befinden, tendieren dabei zu primär die Skelettmuskulatur betreffenden Erkrankungsbildern, während Mutationen der DNA im 1B-Segment und der

Tail-Domäne eher zu kardialen Erscheinungsbildern neigen (Goldfarb et al., 2008). Insbesondere in der Tail-Domäne lokalisierte Mutationen zeichnen sich durch ein frühes Auftreten kardialer Symptomatik aus (Bär et al., 2007). Desminopathien mit kardialer Erstsymptomatik sollen sich gegenüber Desminopathien mit führender skelettomuskulärer Symptomatik durch eine um 4-10 Jahre frühere Manifestation sowie durch einen schnelleren Progress der muskulären Symptome auszeichnen (Goldfarb et al., 2008). Bei unterschiedlichen Phänotypen, ausgelöst durch identische Mutationen, muss festgehalten werden, dass der Pathomechanismus der Desmin-Mutationen noch nicht vollständig verstanden ist. Nach derzeitiger Studienlage ist nicht auszuschließen, dass Mutationen in Genen anderer Proteine oder auch Umwelteinflüsse den Krankheitsverlauf sowie die Schwere der Erkrankung maßgeblich beeinflussen (Goldfarb et al., 2008). Im folgenden werden beispielhaft Mutationen aus verschiedenen Segmenten des Desmin-Gens mit charakteristischen klinischen Erscheinungsbildern beschrieben und der von uns detektierten Mutation p.A213V gegenübergestellt. Auf die synonyme Mutation p.L136L (c.408C>T) wird wegen seiner fehlenden Änderung der Aminosäuresequenz in diesem Abschnitt nicht weiter eingegangen. Insgesamt konnte der Basenaustausch von Cytosin nach Thymin an Position 408 des Desmin-Gens bei 6 Patienten der DCM-Kohorte (2,55%) nachgewiesen werden.

Bei der ebenfalls in dieser Arbeit identifizierten Mutation p.A213V handelt es sich um eine Missense-Mutation im 1B-Segment von Desmin, die erstmalig 2005 von Bowles und Mitarbeitern beschrieben wurde und als modifizierender, funktioneller Polymorphismus beziehungsweise einzig bekannter gutartiger Polymorphismus in der DNA-Sequenz der Rod-Domäne des Desmin gilt (Goudeau et al., 2006; Taylor et al., 2007). Sie tritt mit einer Allelfrequenz von ca. 1% auf und ist sowohl in klinisch symptomatischen Patienten als auch in gesunden Individuen von untersuchten Kontrollgruppen nachweisbar (Goudeau et al., 2006; Taylor et al., 2007). Klinisch symptomatische Patienten zeichnen sich dabei durch ein Spektrum heterogener Symptome und einem verhältnismäßig späten Manifestationsbeginn mit langsamem Progress aus, der von progressiver Muskelschwäche ohne kardiale Beteiligung (Goudeau et al., 2006) bis hin zu isolierter dilatativer oder restriktiver Kardiomyopathie reichen kann (Goudeau et al., 2006; Bowles et al., 2005).

Durchgeführte Studien zur Organisation des Filamentgerüsts, bei denen mutations-tragende cDNA in Form von Expressionsplasmiden in Säugerzellen transfiziert wurden, führten in menschlichen Epithelzellen ohne zytoplasmatische, muskelspezifische

Intermediärfilamente vom Typ III (SW13-Zellen) ebenso wie in Maus-Muskelzellen mit Expression von Intermediärfilamenten vom Typ III (C2C12-Zellen) zu keinen strukturell verändernden Effekten (Goudeau et al., 2006; Muñoz-Mármol et al., 1998; Dalakas et al., 2000). Durch diese Versuche konnte so gezeigt werden, dass die Mutation p.A213V keinen Einfluss auf die Formation des Zytoskelettes hat (SW13) beziehungsweise in einem intakten Zytoskelett zu keinen pathologischen Veränderungen führt (C2C12). Bär und Mitarbeiter konnten allerdings in BMGE+H-Zellen eine bündelartige Anlagerung von Filamenten und viskosimetrisch eine Aggregation nachweisen, so dass die Bildung von Intermediärfilamenten durch die Mutation p.A213V gestört sein könnte (Bär et al., 2005a; Bär et al., 2007). Goudeau und Mitarbeiter beschreiben mehrere Patienten mit bestätigter p.A213V-Mutation: Ein niederländischer Patient war dabei zusätzlich Träger von Mutationen im  $\alpha$ -Glukosidase-Gen (p.N91D und p.A261T) und entwickelte sich im Kindesalter im Vergleich zu seiner Altersgruppe hinsichtlich der körperlichen Leistungsfähigkeit langsamer. Des weiteren entwickelte er im Alter von 33 Jahren eine zunehmende Schwäche der proximalen und distalen Extremitätenmuskeln. Während die Serumkreatinkinase um das 50-fache der Norm erhöht war, erwiesen sich die elektro- und echokardiographische Befunde unauffällig. Bei Vorliegen der Desmin-Mutationen p.A213V und  $\alpha$ -Glukosidase-Mutationen p.N91D (Mutter) sowie p.A261T (Vater) blieb die Elterngeneration symptomlos (Goudeau et al., 2006). Nach derzeitiger Studienlage gibt es keinen Hinweis für eine Interaktion zwischen Desmin und  $\alpha$ -Glukosidase, hingegen können bei einzelner Betrachtung Mutationen in beiden Genen für sich Muskelpathologien auslösen, was die Annahme eines modifizierenden Einflusses der p.A213V-Mutation stützt (Goldfarb et al., 2008). Ein weiterer Patient russischer Herkunft präsentierte sich im Alter von 65 Jahren mit den Symptomen einer verminderten körperlichen Leistungsfähigkeit, Dyspnoe, Herzrhythmusstörungen und dilatierten Ventrikeln sowie einem vergrößerten linken Vorhof im Sinne einer dilatativen Kardiomyopathie. Eine Familienanamnese war auch hier unauffällig (Goudeau et al., 2006). Den in der Literatur beschriebenen Patienten gegenübergestellt, zeigen sich bei den von uns detektierten Patienten klinische Symptome vornehmlich kardialer Natur, was durch die Auswahl des Kollektivs zu erwarten war. Der die heterozygote Mutation p.A213V (c.638C>T) tragende Patient B-002330-X war zum Studieneinschluss 56 Jahre alt. Bei diesem Patienten gilt eine familiäre DCM aufgrund von Stammbaumuntersuchungen als gesichert. Bei einer massiven Fibrose im Herzmuskelbiopsat zeigte sich eine eingeschränkte Ejektionsfraktion von 30% und ein LVEDD von 72 mm in der Echokardiographie. Eingehende virologische Untersuchungen mit Einschluss

von Parvo-, Coxsackie- und Enteroviren erbrachten keinen Hinweis auf eine myokardiale Virusinfektion als Ätiologie seiner Herzerkrankung. Die Untersuchung der Familienangehörigen des Patienten auf die Mutation p.A213V erbrachte ebenfalls den Nachweis des entsprechenden Basenaustausches an Position 638 bei weiteren Individuen, ohne dass allerdings bei allen Mutationsträgern Zeichen einer kardialen Erkrankung bestanden hätten. Obwohl beim Patienten B-002330-X sowohl der Polymorphismus p.L136L als auch die Mutation p.A213V nachgewiesen werden konnten, erfolgte unter der Annahme, dass der Polymorphismus p.L136L über keinerlei Pathogenität verfügt, kein Screening der Angehörigen auf diese Basenveränderung. Der zweite Patient B-011583-6 (c.638C>T) litt an einer Myokarditis und wurde bei positiver Familienanamnese für DCM nach den Kriterien von Abbildung 3 in die Studie eingeschlossen. Der klinische Verlauf zum Studieneinschluss war allerdings wesentlich milder. Bei einem Lebensalter von 53 Jahren, einer EF von 50% sowie einem LVEDD von 57 mm in der Follow-Up-Kontrolle war der Patient nur bei starker körperlicher Arbeit in seiner Belastungsfähigkeit eingeschränkt. Eine histologische Untersuchung des Myokards lag bei diesem Patienten nicht vor.

Patientennummer	002330-X	011583-6
Geschlecht	m	m
EF Echo	30	50
LVEDD Echo	72	57
NYHA	3	2
Lebensalter bei Einschluss	56	53
Muskelbiopsat	massive Fibrose	keine
Hinweis auf fam. DCM?	Ja	Ja

Abb. 30: Klinische Phänotypen der in dieser Studie identifizierten, heterozygoten Mutationsträger mit der Mutation p.A213V.

Für die fünf beschriebenen Mutationen (p.R173\_E179del, p.A213V, p.K240fsX243, p.E245D und p.214\_E245del) im 1B-Segment des Desmin sind allesamt kardiale Symptome im Sinne einer Kardiomyopathie beschrieben worden (Muñoz-Mármol et al., 1998; Bowles et al., 2005; Goudeau et al., 2006; Schröder et al., 2003; Vrabie et al., 2005; Park et al., 2000; Arbustini et al., 2000; Arbustini et al., 2006; Shatunov, 2003). Die Pathogenität von Mutationen im 1B-Segment des Desmin-Gens scheint somit, mit Ausnahme der auch von uns detektierten Mutation p.A213V, gesichert. Als alleinige Ursache einer Kardiomyopathie beziehungsweise einer Desminopathie scheint diese Mutation nur eingeschränkt in Frage zu kommen (Goudeau et al., 2006; Taylor et al., 2007; Goldfarb et al., 2008).



Der Großteil der bekannten Mutationen im Desmin-Gen liegt im 2B-Segment, welches von den Exons 5 und 6 kodiert wird (Goldfarb et al., 2008). Eine rein kardiale Symptomatik der Mutationen in diesem Segment ist nur für die Punktmutationen p.S298L, p.D312N und p.R350W beschrieben worden (Taylor et al., 2007). Alle weiteren bekannten Mutationen zeigen eine ausgeprägte Beteiligung der Skelettmuskulatur, auch wenn die initiale Symptomatik durchaus kardialer Natur sein kann (Bär et al., 2007). Gerade diese im zentralen Abschnitt der Rod-Domäne gelegenen Mutationen scheinen eine erhebliche Bedeutung für die Funktion des Intermediärfilamentes zu haben, so dass eine Beteiligung der Skelettmuskulatur möglicherweise schon frühzeitig symptomatisch und in vielen Fällen führend ist (Bär et al., 2007). Dies erklärt sich unter anderem durch die Substitution von Prolin in der Aminosäuresequenz bei insgesamt zehn Mutationen, wobei zu vermuten ist, dass durch die Präsenz dieser Aminosäure die helikale Struktur des Desmin aufgebrochen wird (MacArthur et al., 1991; Raats et al., 1991).

Goldfarb und Mitarbeiter beschrieben 1998 drei Geschwister mit einer Kombination der Mutationen p.A360P und p.N393I, die durch einen kompletten AV-Block, Synkopen und eine im Alter von 2, 9 beziehungsweise 10 Jahren manifest werdende dilatative Kardiomyopathie auffielen. Während die Erkrankung bei den Geschwistern fulminant verlief und früh zum Tod durch progressive Muskelschwäche mit Beteiligung der Atemmuskulatur im Alter von 28, 30 und 32 Jahren führte, ist umso bemerkenswerter, dass zahlreiche Mitglieder der Familie jeweils Träger einer Mutation im Desmin-Gen sind und keinerlei klinische Symptome zeigten (Goldfarb et al., 1998; Goudeau et al., 2006). So zeigt sich auch in diesen Mutationen im 2B-Segment des Desmin-Genes eine inkomplette Penetranz, die in entsprechender Mutationskonstellation zu schweren klinischen Erscheinungsbildern führen kann. Im Gegensatz dazu führt die gegenüber der Mutation p.N393I nur um wenige Basenpaare versetzte p.D399Y-Mutation zum Vollbild der Desminopathie, wie Goudeau und Mitarbeiter bei einem 34-jährigen makedonischen Patienten mit progressiver Muskelschwäche und AV-Block dritten Grades bei dilatativer Kardiomyopathie nachwiesen (Goudeau et al., 2006). Ebenso führen die Mutationen p.L338R, p.E401K und p.R406W zu einer Dysfunktionen von Desmin und sind mit einem schweren Krankheitsverlauf und frühzeitiger Manifestation assoziiert, was sich durch die Art der jeweiligen Punktmutation und deren Lokalisierung erklären ließe (Goudeau et al., 2006). Durch biochemische In-vitro-Analysen zur Filamentbildung lassen sich die zugrundeliegenden Mutationen in diesem Segment in drei Gruppen unterteilen: 1.) Mutation, die die longitudinale Filamentbildung behindern (p.L385P, p.R406W), 2.) Mutationen, die mit einer erhöhten

Adhäsion der Moleküle und Aggregation (p.A337P, p.N342D, p.A357P), und 3.) Mutationen, die mit einer schnellen Desintegration von filamentösen Vorläuferstadien verbunden sind (p.L345P, p.R350P, p.L370P) (Bär et al., 2006).

Mutationen im 1A-Segment stellen nach derzeitiger Studienlage eine Rarität dar. Es sind bislang zwei Mutationen (p.E108K und p.N116S) bekannt, für die sowohl Taylor und Kollegen (2007) als auch Klauke und Koautoren (2010) eine rein kardiale Symptomatik der betroffenen Patienten beschrieben. Da beide Mutationen bislang nur in jeweils einer Familie detektiert worden sind und sie dort für eine familiäre DCM (p.E108K) (Taylor et al., 2007) beziehungsweise für eine ARVC (p.N116S) (Klauke et al., 2010) verantwortlich gemacht werden, kann hier nach aktuellem Forschungsstand festgehalten werden, dass Mutationen des 1B-Segmentes ein isoliert kardiales Erkrankungsbild auslösen können, aber aufgrund der begrenzten Fallzahl und des begrenzten Betrachtungszeitraums nicht ausgeschlossen werden kann, dass diese Mutationen auch eine Beteiligung der Skelettmuskulatur mit einschließen. Dies gilt insbesondere für die Mutation p.N116S, der eine schwerwiegende Beeinträchtigung der zytoskelettalen Filamentformation in SW13-Zellen nachgewiesen werden konnte (Klauke et al. 2010).

Im 2A-Segment des Desmin-Gens sind nach derzeitigem Stand der Wissenschaft bislang keine Mutationen bekannt.

Für Mutationen, die sich in der Rod-Domäne des Desmin-Gens befinden, lässt sich somit sagen, dass der klinische Phänotyp sowohl von der Lokalisierung im Gen, als auch von der Kombination mit anderen Mutationen, teils in anderen Genen, bestimmt wird. Während Mutationen im Segment 2 des Desmin-Gens eher zum klinischen Bild einer ausgeprägten Beteiligung aller muskulären Strukturen führen, so erscheinen die Auswirkungen von Mutationen im Segment 1 zum überwiegenden Teil subtilerer Natur und dominieren durch eine kardiologisch geprägte Klinik mit verschiedenen Formen der Kardiomyopathie und Herzrhythmusstörungen. Durch zellbiologische Daten liegt der Schluss nahe, dass Mutationen, die bereits tiefgreifend in die Formation von Intermediärfilamenten eingreifen, einen so großen Einfluss auf die Funktionsweise der Muskulatur haben, dass generalisierte Symptome im Sinne des Vollbildes einer Desminopathie die Folge sind, während subtilere Mutationen, die einen geringeren oder keinen nachweisbaren Effekt auf die Bildung von filamentösen Zytoskelettgerüsten haben, ihre Pathogenität vornehmlich in der empfindlicheren Herzmuskulatur ausüben. So ist unter anderem zu erklären, wie niedrig pathogene Mutationen wie p.A213V, p.A360P oder p.N393I sowohl in gesunden Kontrollindividuen, als auch in erkrankten Patienten nachweisbar sind und teils zu

fulminanten Krankheitsverläufen führen, wenn sie in Kombination oder mit Mutationen in anderen, die Muskulatur beeinflussenden Genen auftreten (Li et al., 1999; Goudeau et al., 2006). Die These der niedrig pathogenen Mutationen wird zudem durch den in unserer Studie aufgestellten Stammbaum des Patienten B-002330-X gestützt, aus dem ebenfalls eine inkomplette Penetranz ersichtlich wird.

Von den Mutationen der Rod-Domäne grenzen sich die Mutationen in der Head- und Tail-Domäne durch eine unterschiedliche Pathogenese ab. Während beide Domänen in der Interaktion der Intermediärfilamente mit anderen zytoskelettalen Proteinen verantwortlich sind, lösen in der Head-Domäne lokalisierte Mutationen, soweit charakterisiert, einen schweren klinischen Phänotyp mit führender skelettomuskulärer Beteiligung aus. Die Mutationen p.S13F und p.R16C führen dabei zu schweren Alterationen im Aufbau der Filamentstruktur (Sharma et al., 2009; Pica et al., 2008; Arbustini et al., 2006), wohingegen die Mutationen p.S2I, p.S46F und p.S46Y weitaus weniger schwerwiegend den Aufbau des Zytoskeletts beeinflussen (Sharma et al., 2009). Eine Charakterisierung der Funktion der letzten drei genannten Mutationen steht allerdings noch aus.

Mutationen in der Tail-Domäne hingegen üben einen weniger dominant negativen Effekt als in der  $\alpha$ -Helix lokalisierte Mutationen auf die Funktion des Proteins aus (Bär et al., 2007; Dalakas et al., 2003). Für die Mutationen p.E413K, p.K449T und p.R454W ist eine erniedrigte Viskosität als Zeichen einer beeinträchtigten Filamentformation in SW13-Zellen beschrieben, wohingegen die Mutationen p.T442I, p.K449T, p.R454W, p.S460I und p.V469M zu einer so verstärkten Aggregation im Viskometer führen, dass eine Messung nicht mehr durchführbar war. Bei diesen Mutationen überwiegt somit der Effekt einer übermäßigen Bindung von Intermediärfilamenten (Bär et al., 2007). Mutationen in diesem Bereich des Desmin-Gens führen zu dysfunktionalem Verhalten des Moleküls gegenüber dem Kontakt zu anderen Intermediärfilamenten (Bär et al., 2010).

Die hohe Anzahl der kardial betonten Phänotypen in der Tail- gegenüber den in der Head-Domäne lokalisierten Mutationen lässt sich durch die schwerpunktmäßige Funktion in der Mechanosensorik und Signaltransduktion herleiten (Lazarides, 1980; Price, 1984). In Verbindung mit dem hohen Gehalt an Desmin im Reizleitungssystem des Herzens lässt sich so ebenfalls das regelhafte Auftreten von Herzrhythmusstörungen bei den betroffenen Patienten erklären. Für die Tail-Mutationen p.I451M und p.V459I ist zudem, ähnlich der von uns detektierten, in der Rod-Domäne lokalisierten Mutation p.A213V, eine inkomplette Penetranz beschrieben, die sich durch ein Auftreten in erkrankten und gesunden Individuen äußert (Goldfarb et al., 2008; Taylor et al., 2007; Li et al., 1999).

In Zellexperimenten mit SW13- und C2C12-Zellen ergaben sich ähnlich den in der Rod-Domäne lokalisierten Mutationen unterschiedliche Ergebnisse. So formen p.E413K, p.R454W und p.S460I in SW13-Zellen im Gegensatz zu p.T442I, p.K449T, p.I451M und p.V469M zwar keine filamentösen Netzwerke, allen Mutationen ist allerdings gemeinsam, dass sie in bestehenden Intermediärfilamentgerüsten die Desmin-Lokalisation nicht aufheben (Bär et al., 2007). Interaktionen mit anderen zellulären Proteinen und Zellorganellen führen zu einer heterogenen Gruppe von klinischen Symptomen, insbesondere wenn die Mutationen in der Head- und Tail-Domäne des Desmin-Proteins lokalisiert sind (Goldfarb et al., 2008; Bär et al., 2007). Den Mutationen p.R454W und p.S460I ist dabei gemeinsam, dass sie sich durch eine frühe kardiale Beteiligung neben einer ausgeprägten skelettomuskulären Ausbreitung auszeichnen. Im Alter zwischen 15 und 35 Jahren sind diese Patienten meist mit Symptomen der Dyspnoe bei bereits ausgeprägter kardialer Beteiligung – in erster Linie Herzrhythmusstörungen – klinisch auffällig geworden. Im weiteren Krankheitsverlauf imponierte dann auch eine zunehmende Beteiligung der Skelettmuskulatur, die sich sowohl auf die distale wie auch die proximale Extremitätenmuskulatur auswirkte (Bär et al., 2007). Bei der Mutation p.T442I fehlt hingegen die frühe kardiale Beteiligung, während eine rasch progressive Schwäche der Skelettmuskulatur dominiert (Bär et al., 2007). In den meisten Fällen ist ein Hinweis auf die Erkrankung bereits laborchemisch durch eine exzessive Erhöhung der Serumkreatinkinase gegeben. Eine Muskelbiopsie zeigte regelhaft zahlreich vorhandene und ausgedehnte Anti-Desmin-reaktive Aggregate und fleckförmige, elektronendichte Granulofilamentstrukturen vornehmlich nahe den myotendinösen Verbindungsstellen (Junctions) (Bär et al., 2007).

Die bei Desminopathien zu erwartenden histologischen Befunde leiten sich aus zahlreichen tierexperimentellen Studien ab, die vornehmlich in den neunziger Jahren des vergangenen Jahrhunderts an Desmin-Knock-out-Mäusen durchgeführt wurden. Wenn die Fähigkeit zur Expression von Desmin beeinträchtigt ist, entwickelten die Tiere früh in ihrem Leben Kardiomyopathien mit Lyse von Kardiomyozyten, der Einwanderung von Makrophagen und dem Auftreten von Kalzifikation der betroffenen Muskulatur bis es schließlich zu ausgeprägtem bindegewebigem Ersatz der Muskelzellen kam (Thornell et al., 1997). Ältere Individuen zeigten im Verlauf ihres Lebens das klinische Vollbild einer Muskeldystrophie (Milner et al., 1996). Weiterhin zeigten sich mikroskopisch in Größe und Zahl vergrößerte Mitochondrien, die atypisch in der Zelle verteilt waren, was unter mechanischem Stress zu einer Degeneration der betroffenen Zellen führte (Milner et al., 1996; Milner et al., 2000). Der negative Effekt auf die Muskulatur wirkte sich dabei in

gleichem Maße auf die Muskelkontraktilität als auch auf die Relaxation aus (Ahmad et al., 2005).

Der pathologische Prozess beginnt in den Muskelzellen durch die Desintegration der Z-Scheibe, von der man annimmt, dass sie an der Spannungsübertragung zwischen den Sarkomeren beteiligt ist (Selcen et al., 2006). Während die Muskelzellen eine Überexpression von funktionellen Desmin-Proteinen unbeschadet tolerieren (Kumarapeli et al., 2004), kommt es im Falle der Desminopathie zur Anhäufung von Aggregaten aus mutiertem, nicht funktionsfähigem Desmin und anderen myofibrillären und ektopen Proteinen, die sich in den Myofibrillen ansammeln und sie letztendlich zerstören (Wang et al., 2001a; Nakano et al., 1996). Auch wenn bei den von uns genotypisierten Patienten keine Untersuchungen auf das Vorliegen von Desmin-reaktiven Aggregaten durchgeführt wurden, so spiegelt das histologische Bild des Patienten B-002330-X mit nachgewiesener Mutation p.A213V und massiv fibrotischer Herzmuskulatur durchaus die Erwartungen an eine Erkrankung wieder, die durch eine Mutation im Gen des Desmin ausgelöst wurde.

Es lässt sich somit aus der aktuellen Literatur festhalten, dass Desmin-Mutationen mit sehr unterschiedlichen klinischen Erscheinungsbildern abhängig von der Lokalisierung der Mutation im Desmin-Gen und dem Typ des Aminosäureaustausches sind (Goudeau et al., 2006). Die Mutationen treten dabei verschieden häufig in unterschiedlichen Abschnitten des Gens auf. Studien zur Filamentformation bieten dabei einen Anhalt für unterschiedliche Pathomechanismen in der Entstehung der Erkrankung, wobei aus den in vitro durchgeführten Studien nur unzureichend auf die Schwere der Erkrankung betroffener Individuen geschlossen werden kann (Taylor et al., 2007). Für die Schwere der Erkrankung scheint allerdings das Ausmaß einer Integration in präexistente Intermediärfilamente und Interaktionen mit zellulären Organellen, wie zum Beispiel Mitochondrien, maßgeblich zu sein (Bär et al., 2007). Für einige Mutationen, darunter auch die von uns detektierte Mutation p.A213V lässt sich eine inkomplette Penetranz beziehungsweise ein besonders schwerer Krankheitsverlauf in Kombination mit anderen Mutationen nachweisen (Goudeau et al., 2006; Goldfarb et al., 2008; Taylor et al., 2007; Li et al., 1999). Taylor und Mitarbeiter wiesen zudem eine unterschiedliche Penetranz von Mutationen im Desmin-Gen abhängig von ethnischer Zugehörigkeit am Beispiel der p.V459I-Mutation nach, die sich vornehmlich bei schwarzen Amerikanern nachweisen ließ (Taylor et al., 2007).

In der Muskelzelle übernimmt Desmin vielfältige Aufgaben, ist kritisch involviert in der transzellulären Signalgebung sowie im intrazellulären Transport. Störungen in der

Koordination der Muskelfasern führen zu Aberrationen des intermediärfilamentösen Netzwerkes und resultieren in erhöhter Fragilität der Muskelzellen mit verminderter Stresstoleranz, was zu einer reduzierten Überlebensfähigkeit der Zelle führt (Ahmad et al., 2005; Muñoz-Mármol et al., 1998). Die Destabilisierung der verschiedenen Zellorganellen, insbesondere von Mitochondrien und dem endoplasmatischen Reticulum, kann ebenso zum Zelltod führen. Durch die eingeschränkte Funktion der Mitochondrien und deren verminderter Integrität kommt es möglicherweise zu einem Anstieg des oxidativen Stresses und der vermehrten Ausschüttung von Apoptose-auslösenden Faktoren, die auf die Muskelzelle einwirken (Capetanaki et al., 2000). Das Vorkommen von funktionellen Desmin-Proteinen ist somit essentiell für die strukturelle Integrität der Muskulatur, allerdings wohl nicht für die Differenzierung und Fusion von Myoblasten (Paulin et al., 2004b). Es lässt sich derzeit nur mutmaßen, welchen Einfluss das Fehlen von Desmin oder die Anhäufung von Desmin-haltigen intrazellulären Aggregaten auf die Schwere der Erkrankung im Menschen hat (Bär et al., 2007). Besondere Berücksichtigung erfordern bei dem Verdacht auf eine Desmin-abhängige Pathologie zudem die zahlreichen interagierenden Proteine, wie beispielsweise  $\alpha\beta$ -Crystallin. Dysfunktionen insbesondere in diesem Gen sind mit dem Kollaps von Desmin-Netzwerken beschrieben (Wang et al., 2001b). Eine Übersicht über Genmutationen, die ursächlich mit dem klinischen Bild einer dilatativen Kardiomyopathie in Zusammenhang gebracht worden sind, ist der Abbildung 31 zu entnehmen.

Protein-Name	Gen-Name	Protein-Name	Gen-Name
β-Myosin heavy chain	MYH7	αβ-Crystallin	CRYAB
α-Myosin heavy chain	MYH6	Desmin	DES
Myosin light chain essential	MYL3	Ribonucleic acid-binding protein	RBM20
Myosin light chain regulatory	MYL2	Tafazzin G4.5	TAZ
α-Tropomyosin	TPM1	Lamin A/C	LMNA
Cardiac troponin T	TNNT2	Emerin	EMD
Cardiac troponin I	TNNI3	Nesprin-1/SYNE1	SYNE1
Troponin C, slow	TNNC1	EYA4	EYA4
Cardiac actin	ACTC	Thymopoietin	TMPO
Myosin-binding protein C	MYBPC3	SUR2	ABCC9
Titin	TTN	Plakophilin	PKP2
Cypher/ZASP/Lim domain binding 3	LBD3	Desmoplakin	DSP1
Vinculin/metavinculin	VCL	Desmoglein 2	DSG2
Muscle LIM protein	CSRP3	Junction plakoglobin	JUP
Telethonin – TCAP	TCAP	Transthyretin	TTR
Myotilin	TTID, MYOT	Frataxin	FRDA
Myosin VI	MYO6	Long-chain 3-hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase	LCHAD/HADHA
Dystrophin	DMD	HFE, Hemochromatosis gene	HFE
β-Sarcoglycan	SGCB	Amylo-1,6-glucosidase	AGL
α-Sarcoglycan	SGCA	A-Galactosidase (Fabry)	GLA
δ-Sarcoglycan	SGCD	Glycogen branching enzyme	GBE
φ-Sarcoglycan	SGCG	Lysosome-associated membrane protein 2	LAMP2
Fukutin-related protein	FKRP	Mitochondrial complex IV deficiency	multiple
Phospholamban	PLN	Cytochrome C oxidase assembly protein	Cox15

Abb. 31: Übersicht bekannter Gene ursächlich für DCM (Dellefave & McNally, 2010).

Hinsichtlich der Ursache der dilatativen Kardiomyopathie unseres 235 Patienten umfassenden heterogenen Kollektivs liegen umfangreiche klinische Daten vor, doch nur bei einer Minderheit ist die Ätiologie bekannt. Alle Patienten wurden aufgrund der klinischen Diagnose einer dilatativen Kardiomyopathie in die Studie eingeschlossen. Nach Einschluss wurden diverse serologische, histologische und bildgebende Verfahren zur weiteren Diagnostik eingesetzt, so dass sich das Patientenkollektiv bezüglich der Ursache der Erkrankung aufspaltete in bekannte Ursachen, wie beispielsweise Myokarditis und in unbekannte Ursachen einer dilatativen Kardiomyopathie. Eine umfassende molekulargenetische Untersuchung des Patientenkollektivs steht noch aus.

Aufgrund der kardiologischen Fragestellung beschränkte sich die Diagnostik auf den Nachweis eben jener kardiologischen Faktoren, wie die Ermittlung der Pumpfunktion, der Klassifikation der Herzinsuffizienz nach NYHA, der histologischen Untersuchung der Herzmuskulatur und der weiteren Diagnostik. Hinsichtlich einer vorliegenden Erkrankung der Skelett- oder glatten Muskulatur lagen nur unzureichende Informationen vor. Da alle Patienten eine kardiale Symptomatik zeigten, war die Möglichkeit des Auftretens einer Desmin-Mutation mit führender oder rein skelettaler Symptomatik in unserem Patienten-

kollektiv eher unwahrscheinlich. Nichtsdestotrotz kann eine milde Beteiligung der Skelettmuskulatur nicht ausgeschlossen werden.

Mit einem mittleren Alter bei Studieneinschluss von  $51 \pm 12$  Jahren liegt das Alter in unserer Kohorte über dem der üblichen Kohorten von Patienten mit familiärer DCM, ein Hinweis darauf, dass auch nicht-familiäre, spontane Fälle in unserem Studienkollektiv eingeschlossen waren (Mestroni et al., 1999b). Zwar ist gerade bei Desmin-Mutationen eine hohe Rate von Neumutationen zu erwarten (Goldfarb et al., 2004), jedoch handelt es sich im Vergleich zu anderen Genmutationen, die ebenfalls eine DCM auslösen können, um relativ seltene Mutationen. Taylor und Mitarbeiter empfehlen aus diesem Grund ein Screening auf Desminmutationen erst im zweiten Schritt und präferieren ein erstes Screening auf häufiger krankheitsassoziierte Mutationen wie zum Beispiel Lamin A/C (Taylor et al., 2007). Unter Wertung der Besonderheiten unseres Patientenkollektivs sollten sich im Bezug auf die Lokalisierung der zu erwartenden Mutationen nach aktueller Studienlage die Regionen 1B, gegebenenfalls 2B sowie die Tail-Domäne als Schwerpunkte erweisen (Vergleiche hierzu Abbildung 29); durch den Nachweis der Mutation p.A213V in der Region 1B wurde diese Hypothese bestätigt.

Der Nachweis der Mutationen gelang mittels PCR und verschiedenen Methoden der Gelelektrophorese. Neben der Agarose-Gelelektrophorese zur jeweiligen Erfolgskontrolle der PCR-Amplifikation wurden die Verfahren der denaturierenden Gradienten-Gel-Elektrophorese (DGGE) und ergänzend der Einzelstrang-Konformations-Analyse (SSCP) eingesetzt. Das Verfahren der DGGE ist dabei vornehmlich aus der Mikrobiologie bekannt, wo es zur Charakterisierung von Populationsstruktur und -dynamik eingesetzt wird. Aufgrund ihrer hohen Sensitivität erlangte die DGGE auch in der medizinischen Forschung beim Screening von Mutationen an Stellenwert und ist ebenso wie die SSCP-Analyse in der Lage, Punktmutation in PCR-Produkten aus dem genomischen Material nachzuweisen. Der theoretische Hintergrund von DGGE als auch SSCP beruht auf dem unterschiedlichen Laufverhalten von Hetero- und Homoduplex-Strukturen in Gelen. Während bei der SSCP-Analyse die Auftrennung nach Sekundärstruktur der einzelsträngigen PCR-Produkte in einem nicht-denaturierenden Gel erfolgt, wird bei der DGGE das Schmelzverhalten von DNA-Fragmenten verglichen, was durch den Einfluss des denaturierenden, Acrylamid-haltigen Geles und der Temperatur während des Gellaufes erreicht wird. Die Verfahren ergänzen sich somit im Nachweis von Mutationen mittels Gelelektrophorese. Insbesondere bei der DGGE gestaltete sich dabei der Vergleich von Proben, die auf unterschiedlichen Gelen aufgetrennt wurden, als schwierig, aufgrund von



individuellen Unterschieden beim Gießen der Gradienten-Gele (Spiegelman et al., 2005). Als weitere Schwierigkeit bei der Durchführung der DGGE stellte sich die Auswertung der Gele selbst dar, die nach der Färbung in Ethidiumbromid-Lösung von den Glasplatten der Gelkammern auf den UV-Tisch der Lichtkammer transferiert werden mussten. Die labilen Gele mussten mit entsprechender Vorsicht behandelt und trotzdem zügig auf den UV-Tisch gelegt werden. Hierbei kam es immer wieder zu einem Umschlagen des Geles oder einer Veränderung der Lokalisierung auf dem UV-Tisch, was manuell korrigiert werden musste. Auf dem Gel hinterlassene Spuren imponierten dabei unter UV-Licht durch veränderte Belichtungszeiten und der teils undeutlichen Darstellung von Banden, die häufig eine Wiederholung des Versuches erforderten. Da das initiale Primerdesign auf die Verwendung der DGGE abzielte, sind die Primer mit der für diese Technik spezifischen Besonderheiten versehen, wie einem sogenannten GC-Clamp, als auch einer Begrenzung der untersuchbaren DNA-Fragmentlänge, die in der DGGE typischerweise <500 Basenpaare betragen sollte (Muyzer et al., 1998). Unsere verwendeten DNA-Fragmente divergieren dabei von 172 Bp (Des 7) bis 595 Bp (Des 4-5) zuzüglich der jeweiligen GC-Clamps. Bei diesen GC-Clamps handelt es sich um eine dem Primer angehängte Abfolge von Guanin und Cytosin, die aufgrund ihrer zwischen einander bestehenden drei Wasserstoffbrückenbindungen zu einer starken Bindung an den Enden des mittels PCR erschaffenen DNA-Fragmentes führt und so die vollständige Schmelze im Gradienten-Gel während der Elektrophorese verhindern soll. Ein solcher GC-Clamp ist bei DNA-Fragmenten, die mittels SSCP-Analyse untersucht werden, nicht vorhanden. Hier findet sich typischerweise ein Phosphatrest am 5'-Primer, so dass vermutet werden kann, dass der GC-Clamp der verwendeten Primer bei der Detektion von Mutationen mittels SSCP die Sensitivität des Verfahrens reduziert haben könnte, wodurch nicht jede Mutation nachweisbar war.

...ggaaagcagccgaaagt**CCCGCCGCCCGCCGCTCGCCCGCCGCGCCCCCTGCCCGCCGCCCCCGCCCG**

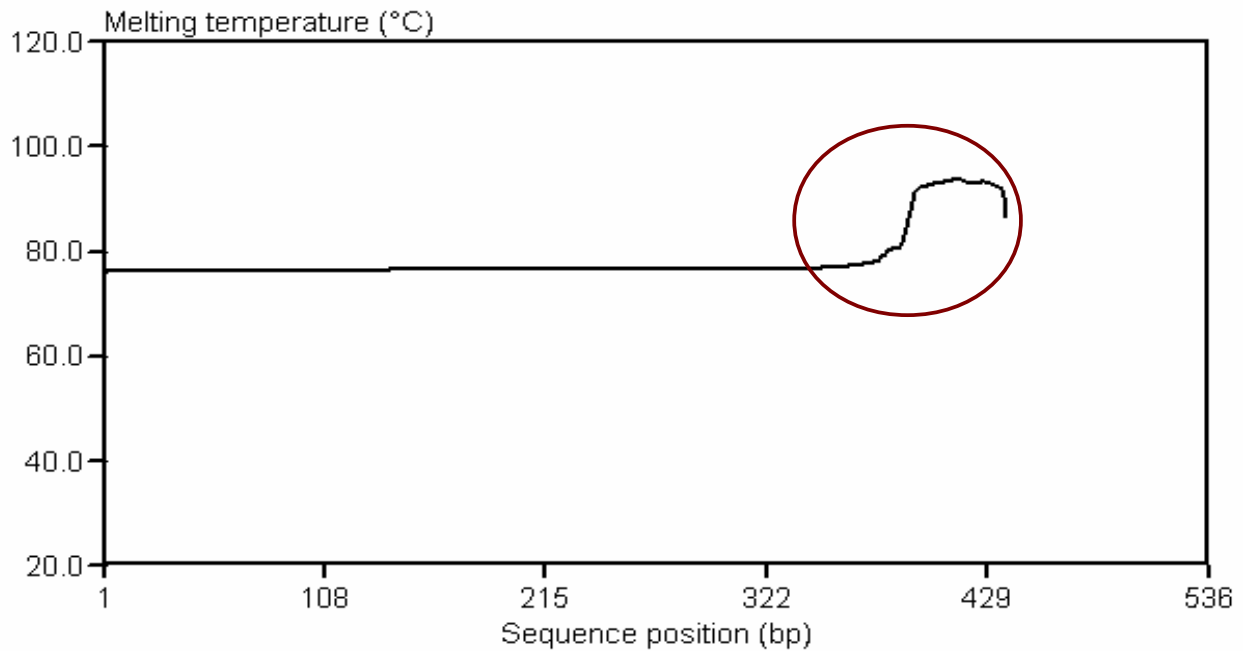


Abb. 32: Einfluss des GC-Clamps (Rot) auf die Schmelzkurve des Primers DES 2-3.

Weiterhin stellte sich der hohe Guanin-Cytosinegehalt des Desmin-Gens als problematisch dar, der stellenweise bei über 70% liegt. Durch die hohe Anzahl an dreifachen Wasserstoffbrückenbindungen pro Einzelbase in GC-reichen Regionen war der Unterschied in den Schmelztemperaturen von Genamplifikat und angehängtem GC-Clamp gering, was zu einer geringen Spanne einsetzbarer Laufzeiten während der Gelelektrophorese und einer eingeschränkten Wahl von Gelgradient und Temperatur führte. Im Bezug auf die gewählten Laufzeiten der DGGE ergibt sich ein zwiespältiges Bild: Nach derzeitiger Empfehlung wird eine Laufzeit von 3 bis 17 Stunden empfohlen (Green et al., 2009). Mit Ausnahme des Primers Des 2-3, dessen Elektrophorese über eine Dauer von 15 Stunden möglich war, orientieren sich die Laufzeiten der anderen Primer am unteren Ende der empfohlenen Laufzeiten. Bei längeren Laufzeiten kam es zu einer Durchwanderung der Proben des Gels, eine Gegensteuerung mit erhöhten Konzentrationen von Acrylamid und höheren Gradienten im Gel hingegen führte zu zügiger Denaturierung, die keine Auswertung der Gele erlaubte. Zeit der Elektrophorese sowie Temperatur und Gradient stellten somit einen Kompromiss zwischen maximaler Sensitivität und Auswertbarkeit der Gele unter UV-Licht dar. Die gesamte mögliche Sensitivität der DGGE konnte somit nicht immer ausgenutzt werden. Aus diesem Grund erfolgte schon bei geringsten Auffälligkeiten im Bandenmuster eine Sequenzierung der entsprechenden Probe, was aber in keinem

anderen Exon als Des 2-3 zum Nachweis einer Mutation führte. Da auch nach langwieriger Optimierung der Parameter der DGGE das elektrophoretische Bild des Exons Des 1\_2 hinter dem der anderen Exons zurück blieb, erfolgte der Entschluss zur ergänzenden Durchführung der SSCP-Analyse bei den Exons 1\_2 und 2-3, was zum Nachweis des Polymorphismus p.L136L führte. Als weitere Besonderheit im Versuchsaufbau der DGGE stellte sich der verwendete Laufpuffer im Falle von Des 2-3 dar, der einem zeitlich versetzt durchgeführten Versuch geschuldet ist. In den Vorversuchen erbrachte die Umstellung des Laufpuffers von TAE auf GTG keine Verbesserung bei der Auswertung des Elektrophoreselaufes.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass auf Basis der durch das untersuchte Gen bestimmten Schwierigkeiten die DGGE sich als ein probates Mittel zum Nachweis von Mutationen erwies, wenngleich durch einen gegenüber der direkten Sequenzierung hohen Aufwand gekennzeichnet und mit bestehender Restunsicherheit im Nachweis von Mutationen behaftet. Am Beispiel des Polymorphismus p.L136L, dessen Nachweis zwar mittels SSCP, aber nicht mittels DGGE gelang, lässt sich so zeigen, dass die Sensitivität der DGGE durch technisch ergänzende Verfahren gesteigert werden kann. Vor dem Hintergrund des Preisverfalls und der steigenden Geschwindigkeit bei der direkten Sequenzierung ist allerdings zu erwarten, dass die unterschiedlichen Verfahren der Gelelektrophorese in Zukunft weiter an Bedeutung verlieren werden. Die detektierte Mutation p.A213V entspricht vor dem Hintergrund der aktuellen Studienlage sowohl von ihrer Lokalisierung im Gen als auch ihrer beschriebenen Pathogenität in unserem heterogenen, aufgrund klinischer Kriterien ausgewählten Patientenkollektiv den Erwartungen. Gegenüber dem Auftreten in der gesunden Normalbevölkerung von ca. 1% ließ sich keine erhöhte Prävalenz in unserem Patientenkollektiv mit dilatativer Kardiomyopathie nachweisen, was die Annahme bestärkt, dass es sich bei p.A213V um eine niedrig pathogene Mutation handelt.

## 5. Zusammenfassung

Bei der dilatativen Kardiomyopathie (DCM) handelt es sich um eine der häufigsten, nicht-ischämischen Herzmuskelerkrankungen, die mit einem chronischen Pumpversagen des Herzens und einem Verlust an Lebenserwartung einhergeht. Es wird angenommen, dass etwa einem Drittel aller Fälle mit DCM eine genetische Ursache zugrunde liegt. Insbesondere Intermediärfilamente stehen als wichtige Bausteine des Zytoskeletts im Verdacht, bei Mutation von kritischen Aminosäureresten kausal an der Pathogenese der DCM beteiligt zu sein. Das in Kardiomyozyten exprimierte Intermediärfilament-Protein Desmin wurde bei bis zu 2% aller familiären DCM-Fälle beschrieben. Mutationen im Desmin-Gen verursachen eine heterogene Gruppe klinischer Erscheinungsbilder, die in dem Krankheitsbild der Desminopathie mit Einschluss von Skelett- und/oder Herzmuskulatur ihren Ausdruck findet. Ursache für die klinische Heterogenität der Desminopathien ist hierbei die Art und Lokalisation der Mutationen mit den sich daraus ergebenden strukturellen Veränderungen in der sarkomeren Organisation des Zytoskeletts. Mit dem Ziel, neuartige Mutationen im Desmin-Gen durch etablierte genetische Screening-Verfahren zu detektieren, wurden insgesamt 235 Patienten mit der klinischen Diagnose einer DCM auf das Vorliegen von Sequenzveränderungen im Desmin-Gen untersucht. Die Untersuchung der DNA erfolgte mittels Einzelstrang-Konformations-Polymorphismus-Analyse (single-strand conformation polymorphism, SSCP) und denaturierender Gradientengel-Elektrophorese (DGGE). Durch den Nachweis des synonymen Polymorphismus p.L136L bei sechs Patienten sowie der niedrig pathogenen p.A213V-Mutation bei zwei weiteren Studienteilnehmern erwiesen sich die genutzten Verfahren für den Nachweis von Mutationen im Desmin-Gen als grundsätzlich geeignet. Die im  $\alpha$ -helikalen 1B-Segment gelegene Missense-Mutation p.A213V fiel in der Stammbaumanalyse durch ihre inkomplette Penetranz auf. Nach Studienlage scheint die p.A213V-Mutation einen modifizierenden Einfluss auf die Funktion des Desmin-Proteins auszuüben, der nicht zwingend zum Bild einer dilatativen Kardiomyopathie führen muss, in Verbindung mit anderen Mutationen aber das klinische Erscheinungsbild und die Schwere der Erkrankung beeinflussen kann. Auffällig waren in unserer Studienkohorte der vergleichsweise geringe Anteil von bekannten sowie das Fehlen von neuartigen Desmin-Mutationen. Weiterhin zeigt die Arbeit, dass die genannten Screening-Methoden grundsätzlich für die Detektion krankheitsassoziierter Mutationen im Desmin-Gen geeignet sind.

## Abstract

Dilated cardiomyopathy (DCM) is one of the most frequent non-ischaemic heart diseases, resulting in systolic heart failure and cardiac death. Mutations in proteins expressed in the myocardium appear to account for approximately one-third or more of all cases, and in the majority of familial cases, mutations in cytoskeletal proteins have been identified as the genetic origin of the disease. The intermediate filament protein desmin, which is localized in sarcomeric distribution in cardiomyocytes, is believed to be responsible for up to 2% of all cases of familial DCM. Pathogenic mutations in the desmin gene have been associated with a broad range of clinical symptoms affecting myocardial, smooth and skeletal muscles, giving rise to a disease entity commonly called desminopathy. In this genetic study, a total study cohort of 235 patients diagnosed as suffering from DCM was tested for the presence of point mutations and/or single nucleotide polymorphisms (SNPs) within the human desmin gene. Single-strand conformation polymorphism analysis (SSCP) and denaturing gradient-gel electrophoresis (DGGE) were used as genetic screening procedures to identify disease-associated desmin mutations. The results from this study demonstrated the presence of the synonymous single nucleotide polymorphism p.L136L in six study participants and, in addition, the low pathogenic p.A213V mutation in two patients. The latter missense mutation resulted in a substitution of a critical amino acid residue in the 1B domain of desmin. The p.A213V mutation was noticed for its low penetrance, since it was also detected in non-affected, healthy family members from one of the index patients. Thus, the p.A213V mutation seems to have a modifying impact on the phenotype of the disease, rather than constituting an obligatory pathological factor for developing the disease. In addition, we show that the applied PCR-based screening procedures applied here are in general useful methods in identifying disease-associated mutations in a cytoskeletal protein such as desmin.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, Kondrashov AS, Sunyaev SR:  
Nat methods 7, S 248-249
2. Ahmad F, Seidman, JG, Seidman CE:  
The genetic basic for cardiac remodelling  
Annu Genomics Hum Genet 2005; 6; S. 185-216
3. Arbustini E, Morbini P, Pilotto A, Gavazzi A, Tavazzi L:  
Genetics of idiopathic dilated cardiomyopathy  
Herz 2000; 25; S. 156-160
4. Arbustini E, Pasotti M, Pilotto A, Pellegrini C, Grasso M, Previtali S, Repetto A, Bellini O, Azan G, Scaffino M, Campana C, Piccolo G, Viganò M, Tavazzi L:  
Desmin accumulation restrictive cardiomyopathy and atrioventricular block associated with desmin gene defects  
Eur J Heart Fail 2006; 8; S. 477-483
5. Arias M, Pardo J, Blanco-Arias P, Sobrido MJ, Arias S, Dapena D, Carracedo A, Goldfarb LG, Navarro C:  
Distinct phenotypic features and gender-specific disease manifestations in a Spanish family with desmin L370P mutation  
Neuromuscul Disord 2006; 16; S. 498-503
6. Ariza A, Coll J, Fernandez-Figueras MT, Dolores Lopez M, Mate JL, García O, Fernandez-Vasalo A, Novas-Palacios JJ:  
Desmin myopathy: A multisystem disorder involving skeletal, cardiac and smooth muscle  
Hum Pathol 1995; 26; S. 1032–1037
7. Bär H, Schopferer M, Sharma S, Hochstein B, Herrmann H, Willenbacher N:  
Mutations in Desmin's carboxy-terminal tail domain severely modify filament and network  
J Mol Biol 2010; 397; S.1188-1198

8. Bär H, Goudeau B, Wälde S, Casteras-Simon M, Mücke N, Shatunov A, Goldberg YP, Clarke C, Holton JL, Eymard B, Katus HA, Fardeau M, Goldfarb L, Vicart P, Herrmann H:  
Conspicuous involvement of desmin tail mutations in diverse cardiac and skeletal myopathies  
Human mutation 2007; 28; S. 374-386
9. Bär H, Mücke N, Ringler P, Müller SA, Kreplak L, Katus HA, Aepli U, Herrmann H:  
Impact of disease mutations on the desmin filament assembly process  
J Mol Biol 2006; 360; S. 1031–1042
10. Bär H, Mücke N, Kostareva A, Sjöberg G, Aepli U, Herrmann H:  
Severe muscle disease-causing desmin mutations interfere with in vitro filament assembly at distant stages  
Proc Natl Acad Sci USA 2005a; 102; S. 15099-15104
11. Bär H, Fischer D, Goudeau B, Kley RA, Clemen CS, Vicart P, Herrmann H, Vorgerd M, Schröder R:  
Pathogenic effects of a novel heterozygous R350P desmin mutation on the assembly of desmin intermediate filaments in vivo and in vitro  
Hum Mol Gen 2005b; 14; S. 1251-1260
12. Bär H, Fischer D, Goudeau B, Kley RA, Clemen CS, Vicart P, Herrmann H, Vorgerd M, Schröder R:  
The biology of desmin filaments: How do mutations affect their structure, assembly, and organisation?  
J Struct. Biol.; 2004; 148; S. 137-152
13. Boriek AM, Capetanaki Y, Hwang W, Officer T, Dadshah M, Rodarte J, Tidball JG:  
Desmin integrates the three-dimensional mechanical properties of muscles  
Am J Cell Physiol 2001; 280; S. C46–C52
14. Bowles KR, Abraham SE, Brugada R, Zintz C, Comeaux J, Sorajja D, Tsubata S, Li H, Brandon L, Gibbs RA, Scherer SE, Bowles NE, Towbin JA:  
Construction of a high resolution physical map of the chromosome 10q22-q23 dilated cardiomyopathy locus and analysis of candidate genes  
Genomics 2005; 67; S. 109-127

15. Bowles NE, Jimenez S, Vatta M:  
Familial restrictive cardiomyopathy caused by a missense mutation in the desmin gene  
Pediatric Res 2002; 51; 2.abstract #1304
16. Burkhard P, Stetefeld J, Strelkov SV:  
Coiled coil: A highly versatile protein folding motif  
Trends Cell Biol 2001; 11; S. 82-88
17. Burri E, Decker M, Eriksson U, Buser P, Hunziker L:  
28-jähriger Patient mit erfolgreich behandelter dilatativer Kardiomyopathie  
Internist 2008; 49; S. 349-352
18. Capetanaki Y:  
Desmin cytoskeleton in healthy and failing heart  
Heart failure reviews 2000; 5; S. 203–220
19. Carlsson L, Fischer C, Sjöberg G, Robson RM, Sejerson T, Thornell LE:  
Cytoskeletal derangements in hereditary myopathy with a desmin L345P mutation  
Acta Neuropathol 2002; 104; S. 493–504.
20. Dagvadorj A, Olivé M, Urtizberea JA, Halle M, Shatunov A, Bönnemann C, Park KY, Goebel HH, Ferrer I, Vicart P, Dalakas MC, Goldfarb LG :  
A series of West European patients with severe cardioskeletal myopathy associated with a de novo R406W mutation in desmin  
J Neurol 2004; 251; S. 143-149
21. Dagvadorj A, Goudeau B, Hilton-Jones D, Blancato JK, Shatunov A, Simon-Casteras M, Squier W, Nagle JW, Goldfarb LG, Vicart P:  
Respiratory insufficiency in desminopathy patients caused by introduction of proline residues in desmin C-terminal  $\alpha$ -helical segment  
Muscle Nerve 2003; 27; S. 669-675
22. Dalakas MC, Dagvadorj A, Goudeau B, Park KY, Takeda K, Simon-Casteras M, Vasconcelos O, Sambuughin N, Shatunov A, Nagle JW, Sivakumar K, Vicart P, Goldfarb LG:  
Progressive skeletal myopathy, a phenotypic variant of desmin myopathy associated with desmin mutations  
Neuromuscul Disord 2003; 13; S. 252-258



23. Dalakas MC, Park KY, Semino-Mora C, Lee HS, Sivakumar K, Goldfarb LG:  
Desmin myopathy, a skeletal myopathy with cardiomyopathy caused by  
mutations in the desmin gene  
N Engl J Med 2000; 342; S. 770-780
24. Dellefave L, McNally EM:  
The genetics of dilated cardiomyopathy  
Curr Opin Cardiol. 2010; 25; S. 198-204
25. Elliott P, Andersson B, Arbustini E, Bilinska Z, Cecchi F, Charron P, Dubourg O,  
Kühl U, Maisch B, McKenna WJ, Monserrat L, Pankuweit S, Rapezzi C, Seferovic  
P, Tavazzi L, Keren A :  
Classification of the cardiomyopathies: A position statement from the  
European society of cardiology working group on myocardial and pericardial  
diseases  
European Heart Journal 2008; 29; S. 270-276
26. Engel AG:  
Myofibrillar myopathy  
Ann Neurol 1999; 46; S. 681–683
27. Fidzianska A, Kotowicz J, Sadowska M, Goudeau B, Walczak E, Vicart P,  
Hausmanowa-Petrusewicz I:  
A novel desmin R355P mutation causes cardiac and skeletal myopathy  
Neuromuscul Disord 2005; 15; S. 525-531
28. Frey N, Katus HA:  
Die dilatative Kardiomyopathie als genetische Erkrankung  
Internist 2008; 49; S. 43-50
29. Fuchs E, Weber K. :  
Intermediate filaments: Structure, dynamics, function and disease  
Annu Rev Biochem 1994; 63; S. 345–382
30. Goebel HH, Voit T, Warlo I:  
Immunohistologic and electron microscopic abnormalities of desmin and  
dystrophin in familial cardiomyopathy and myopathy  
Rev. Neurol. 1994; 150; S. 452–459

31. Goldfarb LG, Park KY, Cervenakova L, Gorokhova S, Lee HS, Vasconcelos O, Nagle JW, Semino-Mora C, Sivakumar K, Dalakas MC:  
Missense mutations in desmin associated with familial cardiac and skeletal myopathy  
Nat Genet 1998; 19; S. 402-403
32. Goldfarb LG, Vicart P, Goebel HH, Dalakas MC:  
Desmin myopathy  
Brain 2004; 127; S. 723-734
33. Goldfarb LG, Olivé M, Vicart P, Goebel HH:  
Intermediate filament diseases: Desminopathy  
Adv Exp Med Biol 2008; 642; S. 131–164
34. Goudeau B, Rodrigues-Lima F, Fischer D, Casteras-Simon M, Sambuughin N, de Visser M, Laforet P, Ferrer X, Chapon F, Sjöberg G, Kostareva A, Sejersen T, Dalakas MC, Goldfarb LG, Vicart P:  
Variable pathogenic potential of mutations located in the Desmin  $\alpha$ -helical domain  
Human Mutation 27; 2006; S. 906–913
35. Goudeau B, Dagvadorj A, Rodrigues-Lima F, Nédellec P, Casteras-Simon M, Perret E, Langlois S, Goldfarb L, Vicart P:  
Structural and functional analysis of a new desmin variant causing desmin-related myopathy  
Hum Mutat 2001; 18; S. 388-396
36. Green SJ, Leigh MB, Neufeld JD:  
Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) for microbial community analysis  
Timmis KN (Ed) Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology  
Springer (Heidelberg, Germany); 2009; S. 4137-4158
37. Heins S, Aebi U:  
Making heads and tails of intermediate filament assembly, dynamics and network  
Curr Opin Cell Biol 1994; 6; S. 25-33

38. Herrmann H, Häner M, Brettel M, Müller SA, Goldie KN, Fedtke B, Lustig A, Franke WW, Aebi U:  
Structure and assembly properties of the intermediate filament protein vimentin: The role of its head, rod and tail domains  
J Mol Biol 1996; 264; S. 933-953
39. Herrmann H, Aebi U:  
Intermediate filaments: Molecular structure, assembly mechanism and integration into functionally distinct intracellular scaffolds  
Annu Rev Biochem 2004; 73; S. 749–789
40. Kamińska A, Strelkov SV, Goudeau B, Olivé M, Dagvadorj A, Fidzianska A, Simon-Casteras M, Shatunov A, Dalakas MC, Ferrer I, Kwiecinski H, Vicart P, Goldfarb LG:  
Small deletions disturb desmin architecture leading to breakdown of muscle cells and development of skeletal or cardioskeletal myopathy  
Hum Genet 2004; 114; S. 306-311
41. Klauke B, Kossmann S, Gaertner A, Brand K, Stork I, Brodehl A, Dieding M, Walhorn V, Anselmetti D, Gerdes D, Bohms B, Schulz U, zu Knyphausen E, Vorgerd M, Gummert J, Milting H:  
De novo desmin-mutation N116S is associated with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy  
Hum Mol Genet 2010; 19; S. 4595-4607
42. Kumarapeli ARK, Wang X:  
Genetic modifications of the heart: Chaperones and the cytoskeleton  
J Mol Cell Cardiol 2004; 37; S. 1097-1109
43. Lazarides E:  
Intermediate filaments as mechanical integrators of cellular space  
Nature 1980; 238; S. 249–256.
44. Li Z, Lilienbaum A, Butler-Browne G, Paulin D:  
Human desmin-coding gene: Complete nucleotide sequence, characterization and regulation of expression during myogenesis and development  
Gene 1989; 78; S. 243–254

45. Li D, Tapscoft T, Gonzalez O, Burch PE, Quiñones MA, Zoghbi WA, Hill R, Bachinski LL, Mann DL, Roberts R:  
Desmin mutation responsible for idiopathic dilated cardiomyopathy  
Circulation 1999; 100; S. 461-464
46. Luk A, Ahn E, Soor GS, Butany J:  
Dilated Cardiomyopathy: A review  
Journal for Clinical Pathology 2009; 62; S. 219-225
47. MacArthur MW, Thornton JM:  
Influence of proline residues on protein conformation  
J Mol Biol 1991; 218; S. 397–412
48. Maisch B, Ristic A, Hufnagel G, Funck R, Alter P, Tontsch D, Pankuweit S:  
Dilated cardiomyopathies as a cause of congestive heart failure  
Herz 2002; 27; S. 113-134
49. Maisch B:  
Dilated cardiomyopathy – a syndrome, not a homogenous disease  
Herz 2007; 32; S. 444-445
50. Mestroni L, Maisch B, McKenna WJ, Schwartz K, Charron P, Rocco C, Tesson F, Richter A, Wilke A, Komajda M:  
Guidelines for the study of familial dilated cardiomyopathies  
Eur. Heart J 1999a; 20; S. 93-102
51. Mestroni L, Rocco C, Gregori D, Sinagra G, Die Lenarda A, Miocic S, Vatta M, Pinamonti B, Muntoni F, Caforio AL, McKenna WJ, Falaschi A, Giacca M, Camerini:  
Familial dilated cardiomyopathy: Evidence for genetic and phenotypic heterogeneity  
Journal of the American college of cardiology 1999b; 34; S. 181-190
52. Milner DJ, Weitzer G, Tran D, Bradley A, Capetanaki Y:  
Disruption of muscle architecture and myocardial degeneration in mice lacking desmin  
J Cell Biol 1996; 134; S. 1255-1270
53. Milner DJ, Mavroidis M, Weisleder N, Capetanaki Y:  
Desmin cytoskeleton linked to muscle mitochondrial distribution and respiratory function  
J Cell Biol 2000; 150; S. 1283–1298

54. Miyamoto Y, Akita H, Shiga N, Takai E, Iwai C, Mizutani K, Kawai H, Takarada A, Yokoyama M:  
Frequency and clinical characteristics of dilated cardiomyopathy caused by desmin gene mutation in a Japanese population  
European Heart Journal 2001; 22; S. 2284-2289
55. Muñoz-Mármol AM, Strasser G, Isamat M, Coulombe PA, Yang Y, Roca X, Vela E, Mate JL, Coll J, Fernández-Figueras MT, Navas-Palacios JJ, Ariza A, Fuchs E:  
A dysfunctional desmin mutation in a patient with severe generalized myopathy  
Proc Natl Acad Sci USA 1998; 95; S. 11312-11317
56. Muntoni F, Bonne G, Goldfarb LG, Mercuri E, Piercy RJ, Burke M, Yaou RB, Richard P, Récan D, Shatunov A, Sewry CA, Brown SC:  
Disease severity in dominant Emery Dreifuss is increased by mutations in both emerin and desmin proteins  
Brain 2006; 129; S. 1260-1268
57. Murken J, Grimm T, Holinski-Feder E, Zerres K:  
Humangenetik  
7. Auflage; Thieme Verlag, Stuttgart 2006; S. 106
58. Muyzer G, Smalla K:  
Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and Temperature Gradient Gel Electrophoresis (TGGE) in microbial ecology  
Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology 1998; 73; S. 127-141
59. Nakano S, Engel AG, Waclawik AJ, Emslie-Smith AM, Busis NA:  
Myofibrillar myopathy with abnormal foci of desmin positivity. Light and electron microscopy analysis of 10 cases  
J Neuropathol Exp Neurol 1996; 55; S. 549–562
60. Olivé M, Armstrong J, Miralles F, Pou A, Fardeau M, Gonzalez L, Martínez F, Fischer D, Martínez-Matos JA, Shatunov A, Goldfarb L, Ferrer I:  
Phenotypic patterns of desminopathy associated with three novel mutations in the desmin gene  
Neuromuscul Disord 2007; 17; S.443-450

61. Park KY, Dalakas MC; Goebel HH, Ferrans VJ, Semino-Mora C, Litvak S, Takeda K, Goldfarb LG:  
Desmin splice variants causing cardiac and skeletal myopathy  
J Med Genet 2000; 37; S. 851-857
62. Parry DA, Steinert PM:  
Intermediate filament structure  
Springer Verlag; New York 1995; S. 1-183
63. Paulin D, Huet A, Khanamyrian L, Xue Z:  
Desminopathies in muscle disease  
J. Pathol; 2004a; 204; S. 418-427
64. Paulin D, Li Z:  
Desmin: A major intermediate filament protein essential for the structural integrity and function of muscle  
Exp Cell Res; 2004b; 301; S.1-7
65. Pica EC, Kathirvel P, Pramono ZA, Lai PS, Yee WC:  
Characterization of a novel S13F desmin mutation associated with desmin myopathy and heart block in a Chinese family  
Neuromuscul Disord 2008; 18; S. 178-182
66. Price MG:  
Molecular analysis of intermediate filament cytoskeleton - Putative load-bearing structure  
Am J Physiol 1984; 246; S. 566–572
67. Pruszczyk P, Kostera-Pruszczyk A, Shatunov A, Goudeau B, Dramińska A, Takeda K, Sambuughin N, Vicart P, Strelkov SV, Goldfarb LG, Kamińska A:  
Restrictive cardiomyopathy with atrioventricular conduction block resulting from a desmin mutation  
Int J Cardiol 2006; 117; S. 244-253
68. Raats JMH, Henderik JBJ, Verdijk M, van Oort FL, Gerards WL, Ramaekers FC, Bloemendal H:  
Assembly of carboxy-terminally deleted desmin in vimentin-free cells  
Eur J Cell Biol 1991; 56; S. 84–103.

69. Rogers KR, Eckelt A, Nimmrich V, Janssen KP, Schliwa M, Herrmann H, Franke WW:  
Truncation mutagenesis of the non- $\alpha$ -helical carboxyterminal tail domain of vimentin reveals contributions to cellular localization but not to filament assembly  
Eur J Cell Biol 1995; 66; S.136–150
70. Schönberger J, Zimmer M, Ertl G:  
Genetik der dilatativen Kardiomyopathie  
Deutsches Ärzteblatt 2004; 16; S. 1099-1105
71. Schröder R, Furst DO, Klasen C, Reimann J, Herrmann H, van der Ven PF:  
Association of plectin with Z-discs is a prerequisite for the formation of the intermyofibrillar desmin cytoskeleton  
Lab Invest 2000; 80; S. 455–464
72. Schröder R, Goudeau B, Simon MC, Fischer D, Eggermann T, Clemen CS, Li Z, Reimann J, Xue Z, Rudnik-Schöneborn S, Zerres K, van der Ven PF, Furst Do, Kunz WS, Vicart P:  
On noxious desmin: Functional effects of a novel heterozygous desmin insertion mutation on the extrasarcomeric desmin cytoskeleton and mitochondria  
Hum Mol Genet 2003; 109; S. 657-669
73. Selcen D, Ohno K, Engel AG:  
Myofibrillar myopathy: Clinical, morphological and genetic studies in 63 patients  
Brain 2004; 127; S. 439-451
74. Selcen D, Engel AG:  
Myofibrillar myopathy  
GeneReviews 2006
75. Sharma S, Mücke N, Katus HA, Herrmann H, Bär H:  
Disease mutations in the head domain of the extra-sarcomeric protein desmin distinctly alter its assembly and network-forming properties  
J Mol Med 2009; 87; S. 1207-1219
76. Shatunov A:  
Desmin splice variants causing cardiac and skeletal myopathy  
Am J Hum Genet. 2003; 73; Abstract

77. Sjöberg G, Saavedra-Matiz CA, Rosen DR, Wijsman EM, Borg K, Horowitz SH, Sejersen T:  
Missense mutation in the desmin rod domain is associated with autosomal dominant distal myopathy and exerts a dominant negative effect on filament formation  
Hum Mol Genet 1999; 8; S. 2191-2198
78. Spiegelman D., Whissell G., Greer C.W.:  
A survey of the methods for the characterization of microbial consortia and communities  
Canadian Journal of Microbiology 2005; 51; S. 355-386
79. Strelkov SV, Herrmann H, Geisler N, Wedig T, Zimbelmann R, Aebi U, Burkhard P:  
Conserved segments 1A and 2B of the intermediate filament dimer: Their atomic structures and role in filament assembly  
EMBO J 2002a; 21; S. 1255-1266
80. Strelkov SV, Burkhard P:  
Analysis of  $\alpha$ -helical coiled coils with the program TWISTER reveals a structural mechanism for stutter compensation  
J Struct Biol 2002b; 137; S. 54–64
81. Suguwara M, Kato K, Komatsu M, Wada C, Kawamura K, Shindo PS, Yoshioka PN, Tanaka K, Watanabe S, Toyoshima I:  
A novel de novo mutation in the desmin gene causes desmin myopathy with toxic aggregates  
Neurology 2000; 55; S. 986-990
82. Taylor MR, Slavov D, Ku L, Di Lenarda A, Sinagra G, Carniel E, Haubold K, Boucek MM, Ferguson D, Graw SL, Zhu X, Cavanaugh J, Sucharov CC, Long CS, Bristow MR, Lavori P, Mestroni L; Familial Cardiomyopathy Registry; BEST (Beta-Blocker Evaluation of Survival Trial) DNA Bank:  
Prevalence of desmin mutation in dilated cardiomyopathy  
Circulation 2007; 115; S. 1244-1251
83. Thornell L-E, Carlson L, Mericskay M, Li Z, Paulin D:  
Null mutation in the desmin gene gives rise to a cardiomyopathy  
J Mol Cell Cardiol 1997; 29; S. 2107-2124



84. Vicart P, Caron A, Guicheney P:  
A missense mutation in the  $\alpha\beta$ -crystallin chaperone gene causes a  
desmin-related myopathy  
Nat. Genet. 1998; 20; S. 2191–2198
85. Viegas-Péquignot E, Li Z, Dutrillaux B, Apiou F, Paulin D:  
Assignment of human desmin gene to band 2q35 by nonradioactive in  
situ hybridization  
Hum Genet 1989; 83; S. 33–36
86. Vrabie A, Goldfarb LG, Shatunov A, Nägele A, Fritz P, Kaczmarek I, Goebel HH:  
The enlarging spectrum of desminopathies: New morphological  
findings, eastward geographic spread, novel exon 3 desmin mutation  
Actual neuropathology 2005; 109; S. 411-417
87. Wang X, Osinska H, Dorn GW:  
Mouse model of desmin-related cardiomyopathy  
Circulation 2001a; 103; S. 2402–2407
88. Wang X, Osinaka H, Klevitsky R:  
Expression of R120G –  $\alpha\beta$ -Crystallin causes aberrant desmin and  $\alpha\beta$   
-Crystallin aggregation and cardiomyopathy in mice  
Circ Res 2001b; 89; S. 84–91
89. Weber K, Geisler N:  
Intermediate filaments: Structural conservation and divergence  
Ann NY Acad Sci 1985; 455; S.126–143
90. Yuri T, Miki K, Tsukamoto R, Shinde A, Kusaka H, Tsubura A:  
Autopsy case of desminopathy involving skeletal and cardiac muscle  
Pathol Int 2007; 57; S. 32-36

## **7. Lebenslauf**

Dieser Abschnitt enthält persönliche Daten



## 8. Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren Damen und Herren in Marburg:

Alter, Aumüller

Barth, Basler, Bauer, Baum, Boudriot

Cetin, Christiansen, Czubayko

Daut

Eilers

Feuser, Fuchs-Winkelmann

Gerdes, Görg, Gress, Grimm, Grzeschik, Gudermann

Hamer, Haselik, Hermann-Lingen, Hertl, Hofmann

Kann, Klose, Koolman, Krieg, Kroll

Lill, Liss, Löffler, Lohoff

Maisch, Martin, Meyer, Moll, Moosdorf, Müller, Mutters

Neubauer

Oertel, Opitz

Pagenstecher, Plant

Ramaswamy, Renz, Richter, Riße, Roeper, Röhm, Rothmund

Schäfer, Schmidt, Schnabel, Schneider, Schofer, Schrader, Seitz, Steiniger, Strempel

Vogelmeier, Vogt

Wagner, Weihe, Werner, Westermann, Wulf

## 9. Danksagung

Ich möchte an dieser Stelle meinen Betreuern Prof. Dr. med. Dr. phil. Dr. rer. nat. Thomas Meyer und Dr. rer. nat. Volker Ruppert danken, ohne deren tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung der Versuche als auch ihren unermüdlichen Einsatz bei der schriftlichen Umsetzung der Ergebnisse diese Dissertationsschrift wohl nie entstanden wäre.

Ich danke meiner Arbeitsgruppe und Mitarbeitern, die aktiv an der Entstehung der Ergebnisse beteiligt waren und meiner Mitdoktorandin Daniela Pietz für die unterhaltsamen Gespräche sowie ihr offenes Ohr für aufkommende Probleme.

Ebenso gebührt mein Dank Prof. Dr. Sebastian Vogt und Prof. Dr. Andreas Brehm, die als Vorsitzender der Prüfungskommission sowie als Korreferent maßgeblichen Anteil an meinem Promotionsverfahren hatten.

Ich danke Christin Zönnchen, Annika Bökenkamp, Chantal Albert und meiner Familie für den Antrieb und die stetige Motivation während all der Jahre, die notwendig waren um Ergebnisse zu erheben und die Dissertationsschrift zu verfassen.

Weiterhin danke ich Sabrina Stein und Patrick O'Neill für die Mitwirkung an der Korrektur von Grammatik und Ausdrucksfehlern in deutscher wie auch englischer Sprache und all jenen, die einen Einfluss auf die Erstellung dieser Arbeit hatten und deren Aufzählung den Rahmen sprengen würde.

## **10. Ehrenwörtliche Erklärung**